

MILLER PEREIRA PALHÃO

AVALIAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO DILUÍDO EM CITRATO-
GEMA, RESFRIADO E ARMAZENADO A 5°C POR 24 HORAS

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

P161a
2006
Palhão, Miller Pereira, 1978-
Avaliação do sêmen caprino diluído em citrato-gema,
resfriado e armazenado a 5° C por 24 horas /
Miller Pereira Palhão. – Viçosa : UFV, 2006.
xvi, 63f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 51-61.

1. Caprino - Resfriamento. 2. Sêmen - Análise. 3. Caprino
Inseminação artificial. 5. Citratos. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.39082

MILLER PEREIRA PALHÃO

AVALIAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO DILUÍDO EM CITRATO-
GEMA, RESFRIADO E ARMAZENADO A 5°C POR 24 HORAS

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: 11 de agosto de 2006

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Co-orientador)

Prof. Marcelo Teixeira Rodrigues
(Co-orientador)

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Pesq.: Jeferson Ferreira da Fonseca

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

A Arte de Ser Bom

Sê bom. Mas ao coração
Prudência e cautela ajunta.
Quem todo de mel se unta,
Os ursos o lamberão.

(Mário Quintana)

Dedico

A Deus.

Não nos compete a glorificação pelas conquistas. Ficamos apenas com o doce sabor de que estamos no caminho certo, rumo ao conhecimento que diminua nossa ignorância.

Somente a “Ele”, cabe o julgamento de cada esforço!

Miller Pereira Palhão

E aos meus pais.

Eles sim, merecem ser glorificados. Mas, por mim! “Eu” sei da luta, presenciei as dificuldades. Estiveram à frente de cada batalha, lutando ao meu lado. Cabe a mim o reconhecimento de que a vitória não é só minha!

Com certeza foram o alicerce e a segurança, com a qual sempre estive apoiado. OBRIGADO!

AGRADECIMENTO

A Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG) por ter me fornecido as condições para a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos, permitindo que tudo fosse concretizado!

Ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao meu orientador: Professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela confiança e pela amizade!

Aos meus conselheiros: Professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela motivação e confiança; Professor Ciro Alexandre Alves Torres, pelos ensinamentos de vida. Obrigado pela contribuição na realização deste trabalho!

A toda minha família (PALHÃO, MARTINS, RIBEIRO) pelo apoio incondicional. Isso ai pessoal, vencemos mais uma!

Aos Meus dois irmãos, que sempre foram uma benção de Deus na minha vida. Duas jóias, que guardo comigo para onde quer que eu vá. Amo vocês!

Aos Doutores: Jefferson Ferreira da Fonseca, pelos ensinamentos e amizade; João Henrique Moreira Viana, pela paciência, ensinamentos e amizade; Anselmo Domingos Ferreira Santos, pela convivência, ensinamentos e grande amizade; Rogério Furst, pelos ensinamentos e pela sua alegria;

Aos companheiros de luta: Herbert, Charles, Fabiana, Reno, Luís Gustavo, Francisco (Chico), Vinícius, Carol, Morgana, Mírian, Gustavo, Laura, Igor, Lincon, Elenice, Nadja, Amélia, Adolfo, Rogério, Flávio, Nívea, Gabriela,

Fabiana Lana, Paulo, PG. O que seria da batalha de cada um se não fosse os companheiros!

A todos os estagiários que colaboraram com a realização deste trabalho: Fábio, Carol, Priscila, Edson, Elizangela, Aline, Amanda, Fabrício, Sueli, Mariana, Raul, Paulinha, Luis, Rodrigo. Este trabalho é de todos nós!

Aos amigos da pequena e pacata cidade de Paraguaçu: Marco Aurélio, João Carlos, Ivan, Alan, Luciano, Livia, Ana Paula, e tantos outros. Como poderia me esquecer de vocês!

Aos amigos de república, Anselmo, Paulim, Bruno, David, Douglas e Fábio, o meu muito obrigado pela convivência saudável e muito proveitosa!

A todos os funcionários dos setores de Caprinocultura, Bovinocultura de Leite, Equideocultura, Bovinocultura de Corte e do Biotério. Obrigado pelas lições, ensinamentos e pela boa convivência!

Aos amigos da Embrapa Gado de Leite, principalmente Gilmar, Alcio e Dudu. Vocês foram muito importantes para mim!

A todos os funcionários e professores do DZO, de coração, o meu muito obrigado!

Por fim, a todos os amigos de Lavras. Como poderia me esquecer de vocês, fizeram e sempre farão parte da minha vida! E viva as.....!

BIOGRAFIA

Miller Pereira Palhão, filho de Milton Pereira Palhão e Tânia Maria Ribeiro Palhão, nasceu a 10 de janeiro de 1978, na cidade de Paraguaçu, estado de Minas Gerais.

Em julho de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-Minas Gerais.

No ano de 2004, especializou-se em Reprodução Animal pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Juiz de Fora, Minas Gerais.

Ingressou, em agosto de 2004, no curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Zootecnia: Área de concentração em Fisiologia da Reprodução Animal, junto ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de dissertação em 11 de Agosto de 2006.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. <i>Resfriamento do Sêmen Caprino</i>	2
2.2. <i>Diluidores</i>	5
2.2.1. <i>Uso da Gema de ovo</i>	5
2.2.2. <i>Uso do Leite</i>	8
2.4. <i>Centrifugação</i>	9
2.3. <i>Hiposmótico (HOST)</i>	10
2.5. <i>Ciclo Estral e Estacionalidade Reprodutiva</i>	12
2.6. <i>Puberdade</i>	15
2.7. <i>Intervalo entre Partos</i>	17
2.8. <i>Nutrição afetando a Reprodução</i>	18
2.9. <i>Inseminação Artificial</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. <i>Local de Realização</i>	25
3.2. <i>Dados Climáticos</i>	25
3.3. <i>Manejo dos Animais</i>	25
3.4. <i>Animais Experimentais</i>	26
3.5. <i>Manipulação do Sêmen</i>	27
3.6. <i>Inseminação Artificial</i>	30
3.7. <i>Diagnóstico de Gestação</i>	31
3.8. <i>Levantamento Reprodutivo do Rebanho</i>	31
3.9. <i>Análise Estatística</i>	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. <i>Condições Ambientais</i>	32
4.2. <i>Animais Experimentais</i>	34
4.3. <i>Características do Sêmen</i>	36
4.4. <i>Fertilidade das Cabras Inseminadas</i>	41
4.5. <i>Dados de Fertilidade do Setor de Caprinocultura (DZO/UFV)</i>	45
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
7. ANEXOS.....	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Variação no comprimento do dia entre as latitudes de -40 sul e + 40 norte, tendo como referencial a linha do Equador (latitude 0). Adaptado de ALLEN <i>et al.</i> , 1998.....	13
Figura 2. Diferentes formas de dobramento da cauda dos espermatozóides caprinos submetidos ao teste hiposmótico (microscópio de contraste de fase, 1000x). (A) indica espermatozóide normal, (B – J) espermatozóides com a cauda dobrada e (K - W) espermatozóides com a cauda fortemente dobrada. Adaptado de FONSECA <i>et al.</i> , 2005.....	30
Figura 3. Número de horas de luz diárias durante a execução do estudo. O dia Juliano tem como referencial o número de dias transcorridos no ano, no caso de 20 de maio (140º dia Juliano) e a 23 de junho (164º dia Juliano). Segundo ALLEN <i>et al.</i> , 1998.....	33
Figura 4. Zona de termoneutralidade e faixa ótima para saúde e produção de caprinos de raças leiteiras especializadas. (Fonte: Smith e Sherman, 1994; Muller, 1982, adaptado de BORGES, 2001).....	34

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Distribuição dos acasalamentos ao longo dos meses, referente aos anos de 2002, 2003, 2004 e primeiro semestre de 2005. (Fonte: Setor de Caprinocultura DZO/UFV).....	46
Gráfico 2. Distribuição da fertilidade dos acasalamentos por meses e a fertilidade média do rebanho, referente aos anos de 2002, 2003, 2004 e primeiro semestre de 2005 (Fonte: Setor de Caprinocultura DZO/UFV).....	47
Gráfico 3. Distribuição do número de serviços por concepção, de acordo com os meses em que aconteceram os acasalamentos e a média do rebanho, referente aos anos de 2002, 2003, 2004 e primeiro semestre de 2005 (Fonte: Setor de Caprinocultura DZO/UFV).....	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Taxa de fertilidade de cabras nulíparas de acordo com a idade e o peso corporal no momento da inseminação artificial.....	16
Tabela 2. Fertilidade de cabras inseminadas, tipo de preservação do sêmen e diferentes períodos de tempo em relação ao início do estro natural.....	24
Tabela 3. Caracterização climática registrada durante o período experimental.....	34
Tabela 4. Dados zootécnicos referentes às cabritas (nulíparas) que foram utilizadas no experimento. ECC (escore médio de condição corporal).....	35
Tabela 5. Dados produtivos e reprodutivos, referentes às cabras lactantes que foram utilizadas no experimento.....	35
Tabela 6. Médias gerais de Motilidade e Vigor, encontradas durante o processamento do sêmen durante todo o período experimental.....	37
Tabela 7. Médias de Motilidade e vigor, seguidas de erro padrão, do sêmen durante as três etapas do processo de resfriamento (S – Saanen; A - Alpina).....	39
Tabela 8. Motilidade, vigor, resposta ao teste de hiposmótico (Host.) e fertilidade (Fert.) de cada bode nos diferentes tratamentos (fresco e resfriado).....	40
Tabela 9. Dados relacionados às cabritas e cabras inseminadas, ao sêmen utilizado em cada inseminação e conseqüente taxa de concepção, em cada um dos tratamentos.....	41
Tabela 10. Resultado da fertilidade das categorias de fêmeas utilizadas, recebendo sêmen fresco ou resfriado.....	43

Tabela 11. Resultado da fertilidade das categorias de fêmeas utilizadas, recebendo sêmen fresco ou resfriado.....	49
---	----

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Média de patologias primárias (segundo CHANDLER, 1988) encontradas no sêmen fresco dos reprodutores, durante todo o período experimental.....	62
Anexo 2. Média de patologias secundárias e terciárias (segundo CHANDLER, 1988) encontradas no sêmen fresco dos reprodutores, durante todo o período experimental.....	62
Anexo 3. Qui-Quadrado, comparando a fertilidade dos acasalamentos de acordo com os meses em que ocorreram.....	63

RESUMO

PALHÃO, Miller Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006. **Avaliação do sêmen caprino diluído em citrato-gema, resfriado e armazenado a 5°C por 24 horas.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-orientadores: Ciro Alexandre Alves Torres e Marcelo Teixeira Rodrigues.

Em nosso país, a caprinocultura leiteira é praticada em propriedades pouco tecnificadas, com produção média em torno de 1 kg de leite/cabra/dia. A utilização da inseminação artificial como ferramenta para o melhoramento genético é dependente dos resultados obtidos nos testes de fertilidade a campo. A utilização do sêmen congelado, além de esbarrar nos problemas de custos, ainda apresenta resultados contraditórios, sendo sua utilização limitada a poucos rebanhos matrizeiros. Já o sêmen fresco tem a limitação do curto tempo de viabilidade, ficando seu uso restrito a própria propriedade. Neste sentido a utilização do sêmen resfriado pode servir de alternativa barata para a multiplicação daqueles reprodutores de maior potencial genético. Assim, o presente estudo visou testar fertilidade *in vivo* do sêmen caprino, diluído em um extensor a base de citrato-gema e armazenado a 5°C por 24 horas. Para tanto, conduziu-se um experimento durante os meses de maio de junho de 2005, no setor de Caprinocultura do DZO/UFV, o qual contou com quatro bodes e 71 cabras e cabritas, das raças Saanen e Alpina. O sêmen foi coletado em vagina artificial, imediatamente centrifugado em meio Ringer Lactato, a 402G por 10 minutos, em seguida o sobrenadante descartado e as células re-suspendidas em meio diluidor a base de citrato-gema, com 20% de gema de ovo, perfazendo um total de 100×10^6 espermatozóides móveis em um volume de 0,25 mL. Após o envase, metade das doses permanecia na bancada e a outra metade era submetida ao processo de resfriamento, com uma curva de aproximadamente 0,5°C/minuto, atingindo a temperatura de geladeira 5°C em 1 hora. De acordo com a ordem de manifestação do estro os animais entravam recebiam duas inseminações intervaladas de 24 horas, sendo a primeira realizada 12 horas após a observação do estro, com sêmen fresco ou resfriado. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 45 dias, com auxílio de um ultra-

som equipado com uma probe de 5 MHz de frequência. Não houve diferenças significativas ($P>0,05$), quanto a fertilidade das cabritas foi de 31,2% (5/16) e 20,0% (4/20), e nem das cabras 44,4% e 17,6%, inseminadas com sêmen fresco e resfriado, respectivamente. Somando cabras e cabritas a fertilidade foi de 38,2% e 18,9%, respectivamente para o tratamento a fresco e resfriado, não sendo significativa a diferença ($P>0,05$). A taxa de concepção geral do experimento foi de 28,2%. Na mesma época do ano, a fertilidade do rebanho em um levantamento dos últimos quatro anos foi de 39,9% (109/273), podendo indicar problemas de fertilidade relacionados às fêmeas. O presente estudo não encontrou diferenças na taxa de concepção para o sêmen diluído em Citrato-Gema com 20% de Gema de ovo e utilizado a fresco ou resfriado e armazenado por 24 horas a 5°C, no entanto, a fertilidade do sêmen resfriado ficou abaixo daquela obtida com a monta controlada no final da estação reprodutiva natural. Fatores climáticos, ambientais e de manejo, além da qualidade zootécnica dos animais, relacionada com o final da estação reprodutiva, podem ter contribuído para as baixas fertilidades encontradas no presente estudo.

ABSTRACT

PALHÃO, Miller Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2006.

Evaluation of the goat semen diluted in egg-yolk citrate, cooled and stored at 5°C for 24 hours. Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: Ciro Alexandre Alves Torres and Marcelo Teixeira Rodrigues.

In Brazil, the dairy goat industry is characterized by a large number of low technology farms, with an average daily milk production per goat of 1 Kg. Semen biotechnologies as artificial insemination (AI) can be an important tool to improve the genetic gain and development of these farms. The use of frozen semen in IA protocols requires a higher level of technology and costs for the farmer when compared with the use of cooled or fresh semen; besides the fertility results from field trials using frozen semen are still doubtful. However the use of fresh semen is restrict to a short period after collected as the viability of the cells decrease fast at environmental temperatures. Therefore the use of cooled semen in low level technology farms can result in a less-expensive and more efficient tool for multiplying the genetic material in these farms. The aim of this study was to evaluate the fertility *in vivo* of goat semen cooled and stored at 5° Celsius for 24 hours. The experiment was realized in the Goat Research Center of the Animal Science Department/Federal University of Vicosa, Brazil, from May until July (end of the natural breeding season) of 2005. Animals from the Alpine (n=2) and Saanen (n=2) breed were utilized as semen donors and a total of 71 females (lactating goats and young goats) from both breeds were used in the fertility trial. Semen was collected by artificial vagina method, diluted in Ringer Lactate solution and centrifuged at 420 G for 10 minutes. After, the semen pellet was rediluted in Egg-yolk (20% v/v) Citrate extender to achieve a total of 400×10^6 spermatozoa/ mL. The semen was stored in 0.25 French straws and then used immediately for AI or cooled (average cooling rate = -0.5 °C/minute) for 1 hour and stored at 5° C for 24 hours before its use for IA. The animals were bred with fresh or cooled semen at 12 hours after the on set of estrus; if the animals continued in estrus for more than 12 hours a second IA was realize at 24 hours after the first insemination. Pregnancy diagnosis was

realized by transrectal ultrasonography using a real time B mode scanner with a 5 MHZ linear array transducer. The ultrasonography evaluations were done at day 45 after first IA. The conception rate for young goats (31.2 x 20,0%) and goats (44.4 x 17.6%) did not differ ($P>0.05$) between fresh or cooled semen, respectively. The total conception rate did not differ ($P>0.05$) between fresh (38.2%) and cooled (18.9%) semen. The average conception rate of this same herd and period was 28.2%. Historical data from the last four years in the same experimental period and farm showed an average conception rate of 39,9% (109/273). The present study didn't find differences in the conception rates for the semen diluted in Yolk-Citrate with 20% of Egg-Yolk and used to fresh or cold and stored by 24 hours to 5°C, however, the fertility of the semen cold was below that obtained with controlled breed in the end of the natural reproductive station. Factors climatic, environmental and of handling, besides the quality of the animals, related with the end of the reproductive station, might have contributed to the low fertilities found in the present study.

1. INTRODUÇÃO

O processo de resfriamento do sêmen caprino e sua posterior utilização na inseminação artificial é uma alternativa viável para pequenos e médios criatórios como forma de aumentar a produtividade de seus rebanhos. Além disso, o resfriamento viabiliza o comércio regional do sêmen de animais geneticamente superiores a um custo mais acessível (SIMPLÍCIO, 1987).

Neste contexto, o desenvolvimento de diluidores, que melhor preservem as características fecundantes do sêmen caprino pós-resfriamento, vem sendo intensamente estudado. O uso da gema de ovo em diluidores, como fonte de fosfolípidios, que protegem a célula espermática durante o resfriamento, é muito difundido na preservação das células espermáticas bovinas. Porém sua utilização em altas concentrações é contestada na espécie caprina, em virtude da presença de substâncias coaguladoras da gema de ovo no plasma seminal (LEBOEUF *et al.*, 2000).

Estudos prévios, realizados na Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Mg, Brasil), analisando os parâmetros espermáticos do sêmen caprino diluído em meio contendo altas concentrações de gema de ovo e posteriormente resfriado a 5°C (BISPO, 2005), demonstraram bons resultados de sobrevivência espermática referente a testes *in vitro*.

O presente estudo tem por finalidade avaliar a fertilidade *in vivo* do sêmen caprino centrifugado e, resfriado a 5°C por 24 horas, utilizando como diluidor o citrato-gema com 20% de gema de ovo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Resfriamento do Sêmen Caprino*

Na conservação das células espermáticas de caprinos são utilizadas duas técnicas básicas: a congelação e o resfriamento (NUNES, 2001). Na primeira técnica mantém-se o sêmen congelado à temperatura do nitrogênio líquido, por tempo indeterminado, podendo aproveitar os reprodutores machos mesmo durante a contra-estação reprodutiva, intensificando o uso dos reprodutores. Na segunda técnica, o sêmen é mantido em temperatura controlada na faixa de 15°C a 4°C, mantendo sua fertilidade por um período de 12 a 24 horas respectivamente (FERNANDEZ-ABELLA, 2003). Sendo esse procedimento indicado para o transporte de sêmen entre propriedades e para utilização durante a estação de monta quando um grande número de fêmeas entra em estro simultaneamente, com a vantagem de não necessitar de grandes investimentos iniciais.

O efeito do frio sobre o resfriamento celular processa-se por meio da redução do metabolismo biológico, observado em condições de diminuição gradativa da temperatura do meio. Este processo foi primeiramente desenvolvido para a preservação de células específicas ou de tecidos, aplicados na medicina para transplantes e transfusões, por determinado período, até que pudessem ser devidamente utilizados (GAO e CRITSER, 2000).

As membranas espermáticas possuem um arranjo conformacional em modelo de mosaico fluído, semelhante ao proposto por SINGER e NICHOLSON (1972). Formada por uma bicamada de lipídios anfipáticos,

contendo proteínas integrais e associadas à periferia da membrana. Apesar da íntima ligação entre lipídios e proteínas, esta ligação não é do tipo covalente, uma vez que as associações preferidas sobre condições fisiológicas normais podem ser modificadas, resultando em uma função alterada ou, no rompimento da membrana (PARKS e GRAHAM, 1992).

Os fosfoglicerídios são lipídios predominantes nas células espermáticas, existindo como parte do complexo lipoprotéico. Em sistemas biológicos, as membranas desempenham uma variedade de funções, destacando-se a regulação no transporte de íons e moléculas solúveis; formação de uma barreira seletiva contínua à célula; abrigo de receptores para interação com agentes de controle metabólico; atua como apoio para uma ótima função enzimática, dentre muitas outras. Qualquer alteração que ocorra no perfil lipídico dos espermatozóides, durante a maturação epididimária e/ou durante o processamento do sêmen, pode influenciar algumas ou mesmo todas estas funções (SCOTT, 1973).

Como a maior fonte de substratos endógenos para a respiração espermática provém de seus fosfolipídios, estes são constantemente hidrolisados, gerando energia para a célula. Desta forma, a capacidade do espermatozóide para sintetizar estes lipídios a partir de substratos externos, pode aumentar sua sobrevivência tanto nos tratos reprodutivos, masculino e feminino, como durante a sua conservação no meio diluidor (SCOTT, 1973). Assim, quando o sêmen é resfriado a temperaturas de 4 a 5°C, a célula passa por uma faixa de temperatura crítica para a sua sobrevivência (de 19 a 8°C) e devem ser protegidas durante esta fase (MCKINNON, 1996).

Com a redução da temperatura alguns lipídios da membrana alcançam a fase de transição termotrófica, passando da fase líquida e cristalina à fase de gel, tendo início uma agregação lipídica. Tão logo a temperatura se aproxima de um ponto crítico, esta agregação lipídica se intensifica, podendo acarretar na formação de miscelas invertidas. Estas por sua vez, permitem a passagem de eletrólitos, prejudicando o equilíbrio osmótico da célula (PARKS e GRAHAM, 1992).

Uma das maneiras de reduzir as perdas celulares durante o resfriamento consiste na utilização de substâncias que minimizem as lesões na membrana plasmática e ofereçam um suporte nutricional, de maneira que sustente um metabolismo basal destas células durante o período de estocagem.

Substâncias ricas em lipoproteínas, como o leite, a gema de ovo, os açúcares (glicose, lactose, frutose, manose, rafinose e trealose), são utilizadas com função crioprotetora, durante o processo de resfriamento do sêmen (MCKINNON, 1996).

O termo choque térmico é empregado para nomear o efeito danoso de variações bruscas de temperatura sobre o espermatozóide. Caracteriza-se por padrão anormal de movimento (movimento circular ou retrógrado), perda de motilidade, lesões no acrosoma, danos na membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares. Muitos destes danos são decorrentes das alterações na membrana ocorridas à medida que os espermatozoides progridem, durante o resfriamento (sendo chamado de choque pelo frio), alcançando as fases de transição da membrana. (GRAHAM, 1996).

Durante o resfriamento, devem ser analisadas com maior atenção as variações que ocorrem no ambiente em que o espermatozóide é exposto. As principais alterações ocorrem na capacidade do espermatozóide sobreviver à passagem por determinadas faixas de temperatura durante o processo resfriamento e/ou congelação, não havendo variação na habilidade da célula de sobreviver nas temperaturas de resfriamento ou congelação (JAMES, 2004). As células espermáticas, ao serem submetidas ao processo de resfriamento, passam por estas faixas de temperatura “crítica”, durante a redução da temperatura e posteriormente durante o seu reaquecimento. Nestes termos, um segundo ponto a ser considerado deve ser a velocidade com que a temperatura do meio é reduzida até atingir a temperatura de estocagem, o que é designado de curva de resfriamento (GAO e CRITSER, 2000).

A conservação do sêmen por períodos curtos é dependente da redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozoides a baixas temperaturas. No sêmen caprino pós-diluído, a velocidade de refrigeração deve estar compreendida entre 0,25 e 0,35°C por minuto, até que seja atingida a temperatura de 5°C. Neste caso, a viabilidade espermática é preservada por alguns dias nesta temperatura de armazenamento (CAMPOS *et al.*, 2001).

A preservação das características fecundantes do sêmen varia de acordo com o período de estocagem (SAHNI, 1987) e com o diluidor utilizado (MATHEW *et al.*, 1982), citados por CAMPOS *et al.* (2001). O sêmen caprino

diluído em meio a base de TRIS, associado a 20 ou 25% de gema de ovo, mantido a uma temperatura constante de 5°C, em pH neutro, pode ser preservado por 8 a 15 dias (CAMPOS *et al.*, 2001), mantendo sua capacidade fertilizante por 6 dias (NISHIKAWA *et al.*, 1961, citado por LEBOEUF *et al.*, 2000).

2.2. Diluidores

A utilização da inseminação artificial em caprinos é limitada em comparação com outras espécies, devido, entre outros fatores, à dificuldade para congelar e descongelar o sêmen e ao efeito tóxico de alguns diluidores sobre as células espermáticas (PALOMINO *et al.*, 2001).

O êxito desta biotecnologia depende em grande parte do desenvolvimento de diluidores satisfatórios, os quais devem aumentar o volume do ejaculado, proteger os espermatozóides durante o resfriamento e prolongar sua vida, além de apresentar um mínimo efeito sobre a fertilidade.

Um relevante número de diluidores tem sido usado em testes de laboratórios e de fertilidade, tais como: salina, citrato de sódio-gema (citrato-gema), citrato de sódio-frutose-gema, sacarose-EDTA, bicarbonato de cálcio-gema, Tris-gema, água de côco (SIMPLÍCIO, 1987), leite em pó ou reconstituído, com ou sem gema de ovo. Atualmente, os meios mais usados para a conservação do sêmen na forma líquida (4-5°C) são: o leite em pó e os diluidores a base de citrato de sódio e Tris (LEBOEUF *et al.*, 2000).

2.2.1. Uso da Gema de ovo

Os primeiros estudos com crioproteção do sêmen caprino foram desenvolvidos a partir do conhecimento já existente para a espécie bovina. Por anos, as técnicas de maior sucesso em bovinos foram os únicos modelos disponíveis para caprinos (CORTEEL, 1992). A gema de ovo foi utilizada no preparo dos diluidores para o sêmen caprino por décadas, mas os resultados observados ficaram aquém daqueles encontrados em bovinos.

Como descrito por ROY (1957), os caprinos possuem na constituição do plasma seminal, um conjunto de enzimas que leva a coagulação da gema de ovo, presente nos diluidores. Estas enzimas pertencem à família das fosfolipases do tipo A_2 , sendo conhecidas como enzimas coaguladoras da gema de ovo (ECGO), são produzidas pelas glândulas bulbo uretrais, e na presença de cálcio hidrolisam a lecitina da gema de ovo, formando, como produtos, ácidos graxos e lisolecitina.

As ECGOs atuam na ligação ester com os grupos acil dos fosfolipídios da gema de ovo liberando ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico) e insaturados (oléico e linoléico), levando a uma queda súbita do pH do meio (pH = 6,0). IRITANI e NISHIKAWA (1961), citado por AMOAH e GELAUYE, (1997), não constataram a presença dessas enzimas no sêmen de bovinos, suínos ou de coelhos. Entretanto, sua atividade de fosfolipases do tipo A_2 foi demonstrada no sêmen de caprinos (ATREJA e ANAND, 1985), hamster (LLANOS *et al.*, 1982), ovinos (ROLDAN e MOLLINEDO, 1991), cobaias (ONO *et al.*, 1982), homem (BENNET *et al.*, 1987) e ratos (TAKKER *et al.*, 1983), todos estes autores foram citados por UPRETI *et al.*, 1997.

Estudos morfológicos de espermatozóides tratados com lisolecitina revelaram a fusão das membranas acrossomal e plasmática, processo que ocorre normalmente durante a reação acrossômica. Com isto, sugeriu-se que as fosfolipases A_2 estejam presentes na membrana plasmática e nas membranas acrossomais. Outras evidências de sua participação no processo de fertilização incluem o aumento na metilação de fosfolipídios, ligados à formação de fosfatidilcolina (um substrato da fosfolipase A_2), durante a capacitação dos espermatozóides de hamster (UPRETI, *et al.*, 1999).

Na maior parte das espécies examinadas, um influxo de Ca^{+2} do compartimento extracelular, é requerido para iniciar a reação acrossômica, liberando enzimas líticas e promovendo alterações de membrana que são importantes para a interação espermatozóide-ovócito (revisado por FRASER, 1987, citado por FRASER e MCDEMORTT, 1992). Este aumento na concentração intracelular de cálcio parece induzir a ativação da fosfolipase A_2 , iniciando o processo de reação acrossômica. Por outro lado, em presença de concentrações elevadas de zinco, magnésio e brometo de p-bromofenacil o processo é inibido (UPRETI *et al.*, 1999).

O Ca^{+2} foi inicialmente considerado como necessário somente no final da capacitação. Segundo YANAGIMACHI *et al.* (1974), citado por GRAHAM (1996), os espermatozoides de cobaias, pré-incubados em meio pobre em cálcio, se tornaram hiperativos e expressaram a reação acrossômica poucos minutos após a introdução de Ca^{+2} extracelular. Entretanto, outros estudos mostraram que espermatozoides incubados em meio deficiente em Ca^{+2} não alcançaram o mesmo desempenho daqueles mantidos em meio rico em Ca^{+2} , quanto à expressão da reação acrossômica e a consequente fertilidade *in vitro* (YANAGIMACHI, 1982; citado por GRAHAM (1996)).

Os trabalhos mostram a importância destas fosfolipases durante os processos fisiológicos dos espermatozoides, a capacitação e reação acrossômica (UPRETI *et al.*, 1999). Portanto, mudanças que ocorrem em sua atividade durante o armazenamento e outros estresses fisiológicos sofridos pelo sêmen no processamento, podem comprometer o sucesso da técnica de preservação, pela ativação prematura dos espermatozoides.

Apesar deste problema, os diluidores contendo gema de ovo são importantes na preservação da fertilidade dos espermatozoides e na preservação das células espermáticas contra o choque pelo frio e as variações de temperatura de armazenamento. PALOMINO *et al.*, 2001, ressaltaram que os melhores resultados encontrados com o citrato-gema, quando comparado a outros diluidores utilizados no resfriamento e armazenamento do sêmen caprino a 4°C, são devido à composição da gema, que contém fosfolipídios, lecitinas, lipoproteínas e cefalinas. Estas substâncias parecem ter uma maior ação protetora e a sua presença na proporção de 3 a 12% reduz de forma evidente os efeitos deletérios do choque pelo frio.

Alguns autores preconizam a retirada do plasma seminal para melhorar os resultados de resfriamento do sêmen (ROY, 1957; CORTEEL, 1974, citado por LEBOEUF *et al.*, 2000). Outros autores também observaram que as ECGO podem ser destruídas pelo aquecimento a 60 °C por 2 a 5 minutos (LEBOEUF *et al.*, 2000).

2.2.2. Uso do Leite

O leite desnatado usado como diluidor também protege os espermatozoides do choque pelo frio, mantendo sua fertilidade, devido à presença de caseínas e pela fração lipídica (PALOMINO, *et al.*, 2001). Sendo considerado um dos mais utilizados extensores de sêmen caprino para uso na inseminação artificial. A capacidade fecundante dos espermatozoides estocados em diluente de leite ou à base de leite é de aproximadamente 12 a 24 horas. O leite é um meio fisiológico, porém complexo. Por isso este componente apresenta-se com muitas variações nos resultados obtidos, e seus mecanismos de ação para preservação celular não estão bem elucidados (LEBOEUF *et al.*, 2003).

O fosfocaseinato nativo é composto pelas caseínas do leite (a, b), foi destacado como sendo o componente mais eficiente em preservar a motilidade e manter a fertilidade do sêmen caprino estocado durante três dias, quando comparado a outros tipos de diluentes (LEBOEUF *et al.*, 2003).

Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao leite, alguns autores observaram a presença de fatores tóxicos aos espermatozoides bovinos no leite não aquecido (THACKER *et al.*, 1954). BOYD *et al.* (1954) sugeriram que o leite fresco, desnatado ou integral, seja aquecido ou tratado quimicamente com substâncias que contêm radicais sulfidrilas com o propósito de aumentar a viabilidade dos espermatozoides bovinos. Esse fator tóxico foi destacado por MIES FILHO (1987) como sendo uma lactenina, um agente enzimático antiestreptococos encontrado no leite e, para inativá-lo é necessário o aquecimento prévio do diluente, a 95 °C, durante um período de 10 minutos.

Em caprinos, a redução na sobrevivência espermática durante o armazenamento em diluentes à base de leite não é somente devido a fatores deletérios presentes no diluente, mas também devido a uma fração protéica semelhante à da glândula bulbouretral do bode, que interage com os constituintes do leite presentes no diluente, inibindo consideravelmente a motilidade dos espermatozoides caprinos. Os componentes responsáveis por esse efeito têm sido recentemente purificados, caracterizados e identificados com uma triacilglicerol lipase (PELLICER, 1995). Essas frações protéicas são nomeadas de SBU III da glândula bulbouretral do bode (Nunes, 1982, citado por LEBOEUF *et al.*, 2000).

2.3. Centrifugação

O processo de centrifugação ou lavagem do sêmen consiste na retirada do plasma seminal, juntamente com as substâncias promotoras de coagulação, assim como a posterior ressuspensão das células espermáticas em meio diluidor devidamente preparado. Este processo foi primeiramente utilizado por ROY (1957) e IRITANI e NISHIKAWA (1961), que observaram uma maior sobrevivência, quando submetidos ao armazenamento a 4 °C, dos espermatozóides previamente lavados, em relação àqueles não submetidos ao processo de lavagem.

PICKETT *et al.* (1975) trabalharam com variações na força de centrifugação (força “G”), com o intuito de avaliar a sua eficácia na retirada do plasma seminal e os danos causados ao espermatozóide eqüino pelo processo. Estes autores encontraram valores ótimos entre 370 e 829 g por 5 minutos, onde os danos espermáticos causados pelo processamento foram menores e, notaram que a manutenção de 10% do plasma, após a centrifugação, estava relacionada com uma maior motilidade pós-descongelamento. Estes mesmos autores, quando utilizaram forças “G” entre valores de 428 e 956 g, observaram uma tendência de menores motilidades quando o sêmen foi lavado sob forças superiores a 956 g, podendo este valor ser o limite superior de resistência destas células. Os valores mais comumente utilizados na lavagem do sêmen caprino se situam entre 600 g (VIANA *et al.*, 2006) e 816 g (CHANDLER *et al.*, 1988), com tempos variando de 10 minutos (VIANA *et al.*, 2006) a 16 minutos (CHANDLER *et al.*, 1988), podendo o processo ser realizado por uma (VIANA *et al.*, 2006; CABRERA *et al.*, 2005) ou duas vezes (CHANDLER *et al.*, 1988).

Em caprinos a remoção do plasma seminal pela lavagem do ejaculado, imediatamente após a coleta aumenta a porcentagem de células vivas e sua motilidade durante o armazenamento em diluidores a base de gema de ovo ou leite. CORTEEL (1974), citado por LEBOEUF *et al.* (2000), utilizando solução fisiológica como meio centrifugador, comprovou o aumento da porcentagem de espermatozóides móveis antes e após o congelamento, o mesmo sendo observado por FUKUHARA e NISHIKAWA (1973), citado por CHANDLER *et al.* (1988), utilizando meio extensor a base de gema de ovo. MEMON e OTT (1981), citado por CHANDLER *et al.* (1988), encontraram taxas de concepção

satisfatórias usando sêmen lavado congelado em meio diluidor a base de gema de ovo. No entanto, RITAR e SALAMON (1982), citado por VIANA *et al.* (2006), recomendaram o uso de 1,5% de gema de ovo, como uma alternativa prática, para evitar a remoção do plasma seminal.

Recentes trabalhos, revisados por LEBOEUF *et al.* (2000), demonstram taxas aceitáveis de sobrevivência espermática pós-descongelamento, utilizando diluidores contendo de 0 a 12% de gema de ovo, tanto para o ejaculado lavado como para o não lavado. Entretanto, a retirada do plasma seminal aumentou marcadamente a sobrevivência a 37°C por 6 horas, especialmente quando 1,5 e 6% de gema de ovo foram utilizadas.

PALOMINO *et al.* (2001), quando compararam os diluidores citrato-gema e leite desnatado-gema, ambos com 20% de gema de ovo, na conservação do sêmen caprino a 4°C, evidenciaram uma clara superioridade do citrato-gema na preservação das células espermáticas, mesmo não procedendo a retirada do plasma seminal. O sêmen manteve uma motilidade progressiva superior a 60% até as 96 horas de armazenamento, enquanto a viabilidade espermática com o leite desnatado-gema não superou as 48 horas.

Apesar dos resultados contraditórios do uso centrifugação juntamente com diluidores a base de gema de ovo (LEBOEUF *et al.*, 2000), alguns autores recomendam sua utilização quando o diluidor possui uma concentração de gema acima de 12% (ROCA *et al.*, 1997).

2.4. Hiposmótico (Host)

A integridade da membrana não é importante somente para o metabolismo espermático, promovendo trocas bioquímicas que permitem a sobrevivência e integridade funcional do espermatozóide. Certas alterações em suas propriedades são requeridas para o sucesso na união dos gametas, para isto, o bom funcionamento da membrana é fundamental. Exemplo destas alterações são os processos de capacitação, a reação acrossômica, e a ligação do espermatozóide a superfície do ovócito (JEYENDRAN *et al.*, 1984). O estresse osmótico tem sido proposto por inúmeros autores (JEYENDRAN *et al.*, 1984; HOSSAIN *et al.*, 1998; NEILD *et al.*, 1999; NEILD *et al.*, 2000; LEBOEUF *et al.*, 2005; BITTENCOURT *et al.*, 2005, FONSECA *et al.*, 2005), como forma de

avaliar a integridade funcional da membrana espermática. A alta condutibilidade hidráulica do espermatozóide dos mamíferos permite que um equilíbrio osmótico via membrana plasmática aconteça em poucos segundos (WATSON *et al.*, 1992).

O teste de hiposmótico foi primeiro proposto para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozóides humanos (JEYENDRAN *et al.*, 1984). Posteriormente, foi adaptado para diversas espécies de animais domésticos: bovinos (REVELL e MRODE 1994), suínos (VASQUEZ *et al.*, 1997), caninos (ROTA *et al.*, 1995), eqüinos (NEILD *et al.*, 1999) e caprinos (FONSECA *et al.*, 2001; SANTOS, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2005), sendo hoje utilizado como um dos testes complementares na avaliação da qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores.

O princípio do teste é baseado no transporte de fluído através da membrana da cauda do espermatozóide, sob condição hiposmótica, até que o equilíbrio entre o meio externo e interno seja alcançado (HOSSAIN *et al.*, 1998). Quando o sêmen é exposto uma solução com osmolaridade inferior a do plasma seminal, os espermatozóides bioquimicamente ativos reagem aumentando seu volume, de maneira que o equilíbrio seja novamente estabelecido entre os fluidos dos compartimentos intracelulares e o ambiente extracelular. Isto culmina com uma expansão da membrana que reveste a cauda, forçando o flagelo, que dobra dentro da membrana (FONSECA *et al.*, 2005). Inúmeros solutos (diferentes açúcares: frutose, melitose, sacarose; bem como diferentes eletrólitos: citrato de sódio e cloreto de sódio), em diferentes concentrações (variando de 0 a 300 mOsm/L), foram testados para determinar a solução e a osmolaridade mais adequadas para as diferentes espécies (JEYENDRAN *et al.*, 1984). Além disso, outra característica avaliada é o padrão de dobramento da cauda e a dinâmica do dobramento esta relacionada a diferenças na composição da cauda ao longo de sua extensão (HOSSAIN *et al.*, 1998). Segundo Fonseca *et al.* (2005), o espermatozóide caprino tem padrão de dobramento similar ao de outras espécies quando exposto a uma solução com osmolaridade variando de 100 – 200 mOsm/L (FONSECA *et al.*, 2001; SANTOS, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2005).

2.5. *Ciclo Estral e estacionalidade reprodutiva*

A cabra é uma espécie que apresenta ovulação espontânea com um intervalo de ciclo estral de 20-21 dias. A duração do estro é mais longo que na ovelha, com a ovulação ocorrendo 30-36 horas após o início da receptividade sexual. Algumas características parecem ser comuns em cabras tanto em regiões temperadas quanto em tropicais (GORDON, 1997).

Na espécie caprina, durações de variáveis no comprimento do ciclo estral são observadas comumente. Em cabras Alpinas, 77% dos ciclos são considerados de duração normal, 14% são de duração curta (< 17 dias) e 9% de duração longa (> 25 dias) (GONSALVES *et al.*, 2002). Esta frequência elevada de ciclos curtos parece ser uma característica da espécie (CHEMINEAU *et al.*, 1987), ocorrendo grande variação de um rebanho para outro, e são mais comuns os ciclos com duração de 5 a 8 dias (CHEMINEAU, 1986).

A duração do comportamento do estro é em média de 30 horas. Todavia, são observadas variações importantes ligadas à raça, à idade e à estação do ano. Já foram observadas durações de estro tão curtas quanto 22 horas e tão longas quanto 96 horas (GONSALVES *et al.*, 2002). Outro fator que pode interferir na duração do estro é o estado nutricional do animal, segundo RONDINA *et al.* (2005), animais subnutridos por um período de nove semanas podem apresentar um maior comprimento do estro e uma maior frequência de ciclos estrais curtos e longos.

Em latitudes superiores a 35° os caprinos são caracterizados como poliéstricos estacionais de dias curtos. Estes animais quando criados em localidades distantes da região equatorial apresentam um comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição das horas de luz do dia. A estação de reprodução desses animais ocorre mais particularmente durante o outono. Em regiões de latitudes inferiores, onde as mudanças do fotoperíodo são mínimas, a estacionalidade reprodutiva é dependente da alimentação, da temperatura e de outros fatores ambientais (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

O anestro sazonal caracteriza-se pela ausência de comportamento estral ou de atividade cíclica ovariana por um determinado período, sendo uma adaptação das espécies selvagens para que suas crias pudessem nascer em

épocas do ano, onde a maior oferta de alimento favoreça sua sobrevivência (THIÉRY *et al.*, 2002).

A figura 1 nos mostra a variação no número de horas diárias de luz ao longo do ano. A latitude (distância em ambos sentidos, norte e sul, em relação ao equador) interfere diretamente na variação no comprimento do dia ao longo do ano.

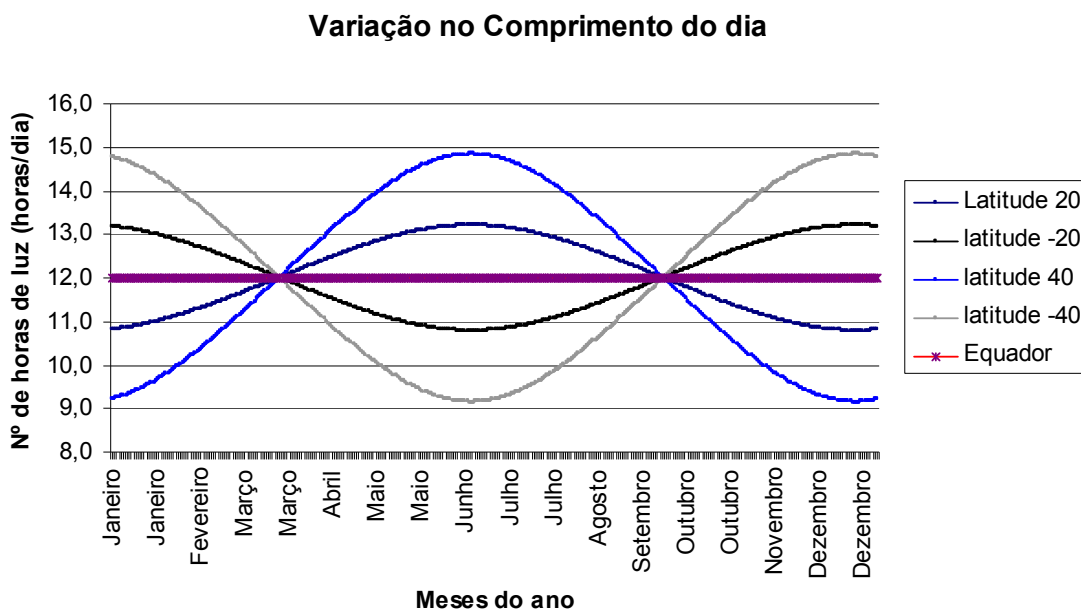


Figura 1. Variação no comprimento do dia entre as latitudes de -40 sul e + 40 norte, tendo como referencial a linha do Equador (latitude 0). Adaptado de ALLEN *et al.*, 1998.

Na maioria das espécies domésticas a variação fotoperiódica é captada por sensores especializados e interpretada via produção de melatonina em resposta a escuridão e sua redução a níveis basais durante as horas de luz diária. Assim, o fotoperíodo anual reflete um ritmo circanual da produção de melatonina, como forma de interpretação de mensagens ambientais. Ovelhas e cabras caracterizam-se por apresentar mudanças no status reprodutivo ao longo do ano, sendo conhecidas como poliéstricas estacionais de dias curtos. As alterações na produção de melatonina acarretam modificações na atividade do eixo gonadotrófico pelas variações na secreção pulsátil do hormônio luteinizante (LH) (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A fotoperiodicidade envolve pelo menos dois mecanismos separados. O primeiro por ação direta da diferença de luminosidade sobre o eixo

hipotalâmico-hipofisário. E no segundo, há uma modificação simultânea na sensibilidade do sistema nervoso central referente à retroalimentação negativa dos esteróides (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A sazonalidade reprodutiva, em cabras e ovelhas, é vista como resultado de uma mudança na responsividade do sistema neuroendócrino a atividade inibitória do estradiol. O estradiol causa uma marcada redução na secreção de gonadotrofinas durante a estação de anestro, o que é reflexo de uma correspondente mudança na ação do estradiol sobre a liberação episódica de GnRH. No carneiro castrado e na égua ovariectomizada, em que não ocorre a retroalimentação negativa dos esteróides sexuais, os níveis de gonadotrofinas atingem um máximo durante a estação de monta normal e, fora dela, diminuem. A variação anual na secreção de melatonina, em resposta aos dias longos e curtos, tem sido incriminada na modulação das diferentes respostas hipotalâmica ao estradiol. Assim, a atividade ovariana cíclica ocorre durante os meses de luminosidade decrescente, quando o efeito inibitório sobre a secreção de LH é reduzido pela maior concentração de melatonina (ZARAZAGA *et al.*, 2005).

Outro hormônio considerado por alguns autores como importante no controle da atividade reprodutiva em caprinos e ovinos é a prolactina (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a concentração de prolactina em caprinos é elevada durante os meses de verão e baixa nos de inverno. A prolactina é um hormônio polipeptídico, produzido pelos mamótrofos da hipófise anterior, responsável principalmente pela promoção da lactação e pelo comportamento materno (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Além de uma atividade luteotrófica pouco significativa nos animais domésticos (papel desempenhado principalmente pelo LH), pode ainda estar envolvida na mediação dos efeitos estacionais e lactacionais na reprodução em animais domésticos.

SANTIAGO-MORENO *et al.* (2000) encontraram níveis circulantes de prolactina superior em ovelhas selvagens (Mouflon), quando comparados com ovelhas domésticas (Manchega), ao longo de todos os meses do ano, mas mantinham um mesmo padrão de secreção. Observaram, também, que os níveis circulantes foram significativamente afetados pela estação do ano, sendo observados os maiores níveis durante os meses da primavera e verão, caindo nos meses de outono e inverno. Para a raça Mouflon, foi visto que os níveis de prolactina aumentavam novamente durante o inverno e a estação reprodutiva nestes animais foi observada durante os meses em que os níveis plasmáticos

de prolactina foram baixos, caracterizando uma estação de acasalamento mais curta para os animais da raça selvagem do que para a raça domesticada. O início da estação de acasalamento foi mais prematuro nos animais domesticados. A seleção para um início precoce da estação reprodutiva é uma característica com herdabilidade razoavelmente alta, podendo explicar uma antecipação da estação.

Outro ponto importante, observado pelos mesmos autores, diz respeito a diferenças encontradas na amplitude noturna dos níveis de melatonina, ao longo do ano. Estas diferenças podem ser parte dos mecanismos genéticos de tradução da mensagem fotoperiódica.

Entretanto, outros estímulos ambientais, disponibilidade de alimento e interações sociais, não devem ser descartados como potenciais reguladores da reprodução sazonal (RIVERA *et al.*, 2003).

Como observado em outros países, onde se observa a estacionalidade reprodutiva em pequenos ruminantes, o comportamento reprodutivo dos animais é dividido em quatro fases ao longo do ano. A primeira é caracterizada pela atividade cíclica ovariana e manifestações de estro em períodos regulares, conhecida com estação natural de acasalamento. O final desta estação é caracterizado pelo crescente número de animais que cessam a atividade ovariana entrando em anestro (fase de transição para o anestro). A fase seguinte, conhecida pela ausência de manifestações de estro, é aquela em que a atividade reprodutiva fica quiescente, sendo conhecida como anestro estacional. O final desta última é marcado pelo crescente número de animais iniciando a atividade cíclica ovariana e as manifestações de estro, sendo chamada de transição para a estação reprodutiva (CORTEEL *et al.*, 1988).

2.6. Puberdade

A taxa de fertilidade conseguida em um programa de inseminação pode ser afetada pela categoria animal utilizada, bem como, fatores relacionados a raça (idade e peso a puberdade) das fêmeas que serão inseminadas. LEBOUF *et al.* (1998), trabalhando com fêmeas nulíparas e múltiparas inseminadas com sêmen congelado, encontraram uma menor fertilidade das primeiras, quando comparadas com cabras em lactação. Os autores citam a

idade a desmama, o crescimento ponderal das novilhas, condição corporal, e idade a primeira inseminação, como possíveis causas dos resultados ruins encontrados nesta categoria animal. Tendências gerais indicam que a fertilidade após a inseminação é maior quando fêmeas nulíparas da raça Alpina atingem uma idade mínima de 8 meses, independente do peso corporal, não sendo confirmado para a raça Saanen (Tabela 1), podendo sugerir um efeito de raça sobre a idade em que os animais atingem a maturidade sexual. Nas condições do Brasil é possível que a nutrição, aliada aos eventos sociais aos quais os animais são expostos, seja o fator mais importante, influenciando diretamente a secreção hormonal que controla esta característica.

Tabela 1. Taxa de fertilidade de cabras nulíparas de acordo com a idade e o peso corporal no momento da inseminação artificial.

Idade (dias)	Peso (Kg)	Raças	
		Alpinas	Saanen
< 240	24-32	54,3 (127)	37,1 (70)
< 240	33-50	51,3 (113)	36,9 (63)
≥ 240	24-32	65,3 (95)	44,1 (34)
≥ 240	33-50	61,2 (134)	53,6 (112)
X ²		ns	ns
		57,8 (469) P<0,06	44,4 (279)

Adaptado de LEBOEUF *et al.*, 1998.

A idade à puberdade, em cabras leiteiras, depende de muitos fatores, dentre eles, citam-se os principais: genéticos, nutritivos, ambientais e de manejo. Os caprinos são animais precoces, que por volta dos 4-5 meses de idade atingem a puberdade e atingem a maturidade sexual em torno de 6-7 meses, estando aptos para a reprodução (RIBEIRO, 1997). A idade é um fator que deve ser avaliado em conjunto com o peso corporal, sendo o mais comumente utilizado a comparação do peso das cabritas com o peso da fêmea adulta em produção. O peso dos animais jovens aptos a entrarem em reprodução deve representar 60 a 70% do peso da fêmea adulta da mesma raça. Levando-se em conta um período de gestação de cabras Saanen estimado em 152 dias (RIBEIRO *et al.*, 1996a), caso as coberturas sejam

realizadas entre 6 e 7 meses de idade, refletirá uma idade ao primeiro parto entre 11 e 12 meses.

O fotoperíodo é um fator que pode influenciar na idade à puberdade. Nas regiões de latitudes médias e altas, o comportamento destes animais é Poliétrico estacional de dias curtos, iniciando a atividade reprodutiva na época do ano em que o fotoperíodo é decrescente, as cabritas que não atingem a puberdade em uma estação, não apresentarão atividade cíclica ovariana antes do segundo ano de vida (GORDON, 1974). Segundo HAAS (1994), citado por RIBEIRO (1997), a maior parte das gestações inicia-se no final do verão e no outono, correspondendo, no Brasil, aos meses de fevereiro a maio, com os últimos estros férteis no início do inverno (julho). Assim, caso as cabritas atinjam o peso e idade mínimos em condições de fotoperíodo crescente (julho-dezembro), só irão apresentar estro na próxima estação de fotoperíodo decrescente (janeiro-junho), fazendo com que a idade à puberdade seja de 12 a 13 meses. De acordo com GONÇALVES (1996), no Brasil, a idade média com que as cabritas das raças Saanen concebem pela primeira vez é 14,4 meses.

O peso dos animais ao nascimento é um indicativo do seu desenvolvimento pós-natal. Geralmente os animais mais pesados ao nascimento têm uma taxa de crescimento mais rápida, atingindo o peso ideal para cobertura em idade mais precoce. Esta característica pode ser afetada pela genética dos animais (raça), sexo da cria (geralmente os machos nascem com peso maior), número de fetos dividindo a mesma gestação, idade da mãe e nutrição da cabra gestante, nos últimos dois meses de gestação (EPSTEIN e HERZ, 1964, citado por BORGES e BRESSLAU, 2003).

2.7. Intervalo de partos

O intervalo de dois partos consecutivos, além de mensurar a eficiência reprodutiva, serve como medida indireta da produtividade de um rebanho. A variação desta característica depende da fertilidade dos animais e, principalmente da sazonalidade na atividade reprodutiva (RIBEIRO, 1997).

Biologicamente, a cabra oferece potencial para parir com intervalos de 7-8 meses, considerando o período de gestação mais 40 dias (em média), após o

parto, para que o útero tenha condições de receber um novo concepto (SIMPLÍCIO, 1992). Porém, a sazonalidade na atividade cíclica ovariana influencia diretamente este processo, tendendo a elevar este intervalo para próximo de 12 meses.

Os intervalos médios obtidos por diversos autores, em dias, por raça e país, variam entre 180 e 480 dias. No Brasil foram observados intervalos de partos de 283 ± 90 dias para animais sem raça definida (SIMPLÍCIO *et al.*, 1982) e 340 ± 13 dias para as raças Saanen, Alpina e Toggenburg (GONÇALVES, 1996).

O intervalo de partos (IEP) pode ser influenciado por diversos fatores ambientais, dentre os quais estão o ano e estação de ocorrência, e o tipo de parto. Uma variação anual no IEP pode ser devida às diferenças nutricionais e sanitárias impostas aos animais, além de uma variação genética (RIBEIRO, 1997).

Partos múltiplos podem ocasionar alterações no IEP, devido ao estresse sofrido pela cabra para gerar e manter a gestação de um maior número de cabritos. Nestes casos, ocorre uma maior mobilização de nutrientes, o que pode estender o intervalo em balanço energético negativo após o parto, sendo necessário um período maior de recuperação até que o animal esteja apto a conceber novamente (RIBEIRO, 1997).

Em animais criados em áreas tropicais o anestro pós-parto geralmente é curto, mas pode variar consideravelmente e a disponibilidade de alimento é tida como principal fator envolvido. Entretanto, o efeito da época do ano em que ocorreu o parto pode ser encontrado em animais bem nutridos (DELGADILLO *et al.*, 1998). Segundo estes mesmo autores, os principais fatores envolvidos são: a nutrição, o período de amamentação após o parto, e a estação de parição. Nas raças Saanen e Alpina o anestro pode variar de 200 a 300 dias em função destes fatores.

2.8. Nutrição e fertilidade

A nutrição é considerada um importante fator afetando a função reprodutiva em ruminantes domésticos, influenciando o início da atividade cíclica ovariana em ovelhas e cabras em pós-parto.

A ovulação é suprimida quando um mamífero está em balanço energético negativo (ZARAZAGA *et al.*, 2005). A energia do alimento ingerido é transformada em fluido metabólico oxidável (glicose ou ácidos graxos não esterificados), que pode ser estocado, na forma de tecido adiposo, ou gasto para satisfazer uma variedade de demandas fisiológicas.

Em tempos de restrição energética (balanço energético negativo) ocorre uma competição entre os diversos tecidos corpóreos, e a atividade ovariana tem uma prioridade, em termos de repartição dos nutrientes, relativamente baixa. Desta forma, a ovulação é sempre suprimida quando a alimentação é restringida além de um nível crítico (BRONSON, *et al.*, 1998).

O controle da distribuição de energia dentro de um organismo é realizado pelo acoplamento de três sistemas principais: o primeiro consiste em um efector central (responsável pela integração das percepções externas e reação orgânica), formado por circuitos noradrenérgicos e serotoninérgicos, que controlam a fome e a saciedade, e atuam via sistema nervoso autônomo determinando se a energia obtida será estocada ou gasta e, onde e como será gasta; o segundo é formado pelos mecanismos envolvidos na percepção rápida dos níveis circulantes de metabólitos oxidáveis, são peptídeos produzidos no trato gastrintestinal agindo centralmente via nervosa (nervo vago) ou circulação periférica, a insulina é importante neste sistema, controlando os níveis circulantes de glicose; o terceiro sistema conota uma resposta lenta às variações dos níveis de metabólitos, resultando em alterações no balanço energético, participam desta via de controle os glicocorticóides, a leptina e a insulina (BRONSON, *et al.*, 1998).

A performance reprodutiva em pequenos ruminantes é comumente relacionada com mudanças sazonais no peso corporal. Um exemplo citado por Zarazaga *et al.* (2005), caracteriza o peso corporal à puberdade para a raça caprina Bôer, como variável em função do nível energético da dieta e severas perdas no peso são usualmente acompanhadas por anestro.

É possível que haja uma relação entre peso corporal e a taxa de ovulação, conseqüentemente fertilidade, entre os animais de uma mesma raça de caprinos. ZARAZAGA *et al.* (2005) observaram que cabras da raça Payoya (Espanhola) com peso vivo menor ou igual a 50 kg apresentaram taxa de ovulação ($1,50 \pm 0,17$) menor do que aquelas de maior peso ($2,10 \pm 0,13$). Este fato pode ser explicado pela diferença na quantidade de reservas corporais

entre estes dois grupos de animais, o que pode ter contribuído para uma maior atividade ovulatória nos animais de maior peso corporal. RONDINA *et al.*, (2005), trabalhando com restrição alimentar (50% da manutenção) em cabras adultas nas condições de Nordeste Brasileiro, observaram um menor número dos animais manifestando estro ou ovulando.

O escore de condição corporal é outra medida das reservas corporais de energia e proteína do animal. Estas reservas são utilizadas no final da gestação, no início da lactação e/ou em épocas de condições ambientais adversas, tendo grande influência sobre o desempenho reprodutivo e produtivo do animal (BORGES e BRESSLAU, 2003). Um sistema foi desenvolvido para cabras leiteiras sendo apropriado para todas as raças (MORAND-FEHR *et al.*, 1989, citado por BORGES e BRESSLAU, 2003). O método de avaliação baseia-se na palpação das regiões lombar e esternal, cada um deles avaliados numa escala de 0 a 5, sendo o escore de condição corporal do animal a média entre os dois pontos.

O estado corporal das cabras em lactação varia ao longo do ano, dependendo da fase do ciclo produtivo e da alimentação. Segundo SMITH e SHERMAN (1994), citado por BORGES e BRESSLAU (2003), no sistema de criação intensivo francês, o escore final de condição corporal deve ser:

- Entre 2,25 e 3,5 na secagem;
- Entre 2,75 e 3,5 no parto;
- Maior do que 2,0 no pico de lactação (45-60 dias pós-parto).

Segundo JENOT *et al.* (2001), citado por BORGES e BRESSLAU (2003), os valores ideais para o escore lombar são:

- 2,75 na secagem;
- Entre 2,25 e 2,5 no parto;
- 2,25 aos 100 dias de lactação;
- Entre 2,5 e 2,75 aos 200 dias de lactação.

Poucos trabalhos na literatura correlacionam o escore de condição corporal ao acasalamento com a fertilidade dos animais. ZARAZAGA *et al.* (2005) não observou diferenças quanto à taxa de ovulação entre grupos de animais com escore de condição corporal menor ou igual a 2,5 e maior ou igual a 2,75. Esta observação pode ter se devido a pequena diferença de escore entre os grupos, podendo, ambos, terem reservas suficientes para não interferir neste parâmetro reprodutivo.

WALKDEN-BROWN *et al.* (1994) observaram uma variação sazonal no peso vivo de bodes da raça Cashmere, criados na Austrália. Os animais apresentaram um aumento no peso vivo durante o inverno e primavera (período em que de luminosidade diária é crescentes), chegando ao máximo no verão, ocorrendo, em seguida um declínio até o inverno (luminosidade decrescente).

Este ciclo de crescimento, segundo estes autores, é influenciado primeiramente por mudanças no consumo voluntário ao longo do ano. Os bodes exibiram consumo deprimido e crescimento negativo durante o outono quando a concentração de testosterona estava elevada e, as taxas de consumo e crescimento máximos, observados na primavera e verão, foram acompanhadas por uma baixa concentração de testosterona. Estes dados sugerem que a testosterona, que possui propriedades anabólicas, pode, quando em concentração elevada, exacerbar o declínio sazonal no consumo voluntário e no crescimento. Entretanto, o ritmo circanual de crescimento e consumo em animais castrados indica que outros fatores estão envolvidos no controle deste processo. Hormônios como Prolactina, Hormônio do Crescimento, T₃ e T₄, têm sido postulados como mediadores potenciais (WALKDEN-BROWN *et al.*, 1994).

Os fatores nutricionais envolvidos nas fases de recrutamento, seleção e ovulação folicular estão diretamente relacionados com a secreção de gonadotrofinas, e são sensíveis a variações de curto período no “status” energético do animal, refletindo as oscilações nos níveis plasmáticos destes hormônios. Em contrapartida, vários estudos demonstram que o desenvolvimento de folículos pré-antrais não são diretamente regulados pelas gonadotrofinas, além disso, o longo período de crescimento desta classe de folículos leva os pesquisadores a hipotetizar uma grande suscetibilidade a períodos prolongados de restrição alimentar (RONDINA *et al.*, 2005).

Fêmeas caprinas recebendo 50% da dieta de manutenção por nove semanas, apresentaram um maior número de folículos primordiais ao exame histológico. Além disso, a espessura da camada granulosa e o tamanho do oócito foram os parâmetros mais afetados, sendo menores que no grupo controle (200% a manutenção). Entretanto, não foram encontradas diferenças nas fases seguintes do desenvolvimento folicular. O maior número de folículos primordiais pode ser um sinal do processo de depleção ocorrido em função do

balanço energético negativo. O menor fluxo nutricional ovariano, por período prolongado, prejudica os estádios iniciais da foliculogênese (RONDINA *et al.*, 2005).

2.9. Inseminação Artificial

A inseminação artificial tem sido praticada desde o início do século passado como uma ferramenta para a rápida mudança genética em animais domésticos (RITAR, 1993). No Brasil, seu uso em caprinos foi registrado, pela primeira vez, em 1954 (SIMPLÍCIO, 1987). O uso desta biotécnica, juntamente com um acurado teste de progênie, tem um importante papel no melhoramento de rebanhos ovinos (FERNANDEZ-ABELLA, 2003) e caprinos (RITAR, 1993), permitindo o uso intensivo de reprodutores geneticamente superiores, para as características desejadas.

Sua utilização, na espécie caprina, similarmente à bovina, é facilitada pela conformação anatômica da cérvix, a qual normalmente é permeável à passagem da pipeta de inseminação durante a fase estrogênica do ciclo estral. A mesma condição não é encontrada na espécie ovina (SIMPLÍCIO, 1987).

As principais vantagens encontradas com a sua utilização são: o baixo custo, quando comparada à obtenção e conservação adequada do sêmen com a aquisição e manutenção de reprodutores; eficaz no controle sanitário de doenças do trato reprodutivo; possibilita o uso de sêmen proveniente de reprodutores testados e comprovadamente superiores; permite o uso de reprodutores de elevado padrão zootécnico, impedidos, por causas mecânicas, de realizar a monta natural; e a obtenção de uma maior descendência de um único reprodutor, quanto comparada à monta natural (SIMPLÍCIO, 1987).

Esta biotécnica consiste na coleta do sêmen, por meio de vagina artificial ou eletro-ejaculação, e na deposição do sêmen no trato genital da fêmea (NUNES, 2001). Porém, a utilização do sêmen a fresco, ou seja, sem o uso de técnicas de conservação, apresenta limitações e está sujeito a considerável redução da viabilidade e praticidade da técnica, pois se limita ao uso imediato, não possibilitando o transporte e disseminação de germoplasma de animais melhoradores ou como alternativa a conservação de raças nativas (AMOAHA e GELAYE, 1997).

A inseminação artificial pode ser realizada tanto pela técnica cirúrgica (laparoscopia) quanto pela não cirúrgica (transcervical) (LEBOEUF, 2000), realizadas durante a estação reprodutiva normal dos animais e durante a contra estação (estação de anestro reprodutivo).

O método de laparoscopia permite a deposição do sêmen dentro do útero e, somado a utilização do sêmen congelado, é comumente utilizado com sucesso na inseminação artificial em caprinos (LEBOEUF *et al.*, 2000). Entretanto, a utilização da laparoscopia fica limitada em função do alto custo do material utilizado, ao passo que o sêmen congelado produz resultados de fertilidade controversos e sua disseminação depende de resultados mais confiáveis (FERNANDEZ-ABELLA, 2003). Logo, a IA com sêmen fresco é usada em cruzamentos nos criatórios, onde o sêmen é coletado e utilizado no mesmo dia da coleta, enquanto no resfriamento o armazenamento pelo frio prolonga a viabilidade espermática podendo o sêmen ser transportado para atender a outros criatórios (LEBOEUF *et al.*, 2003).

O momento da inseminação relacionado ao início da manifestação do estro é de extrema importância, de maneira que permita o encontro dos gametas em momento adequado para a fecundação. A duração do estro varia de 24 a 48 horas, com médias de 36 horas. SIMPLÍCIO *et al.* (2001) recomenda a realização da cobertura, em regime de monta controlada, ou da inseminação artificial entre 10 e 12 horas após a fêmea ter sido observada em estro e repetir, obedecendo ao mesmo intervalo de horas, se os sinais do estro permanecerem após a primeira inseminação.

Uma maior taxa de fertilidade (70%) foi obtida quando a inseminação foi realizada nas primeiras 12 horas do estro. A taxa de fertilidade diminuiu para 63% quando a inseminação foi realizada entre 12 – 24 horas do início do estro, enquanto que as inseminações realizadas após 24 horas responderam por uma taxa de fertilidade de 47% (DAUZIER, 1966) (Tabela 2).

Tabela 2. Fertilidade de cabras inseminadas com sêmen resfriado, em diferentes intervalos, a partir do início do estro natural.

Período (h)	Sêmen	Nº de fêmeas	Fertilidade (%)	Fonte
0-12	Resfriado	742	70,0	Dauzier, 1966
12-24	Resfriado	646	63,0	Dauzier, 1966
24	Resfriado	248	47,0	Dauzier, 1966

Fonte: SIMPLÍCIO, 1987.

SULLIVAN (1970), citado por CHANDLER *et al.* (1988), concluiu que o número de espermatozóides, em cada dose inseminante, necessários para obter uma ótima taxa de não retorno ao estro aos 60-90 dias pós-inseminação, está em função das metodologias de processamento e armazenamento empregadas. NELSON *et al.* (1981), recomendam a diluição do sêmen caprino de forma que a concentração final seja de 400×10^6 células móveis/mL. Contudo, CORTEEL (1977), citado por CHANDLER *et al.* (1988), demonstrou que o número de espermatozóides requeridos para a inseminação é dependente da eficiência da preservação e do local de deposição do sêmen. Em outro trabalho, CORTEEL *et al.* (1988), compararam diferentes doses e volumes inseminantes, não encontrando diferenças quanto ao uso de 100, 150 ou 200×10^6 espermatozóides móveis em um volume de 0,2 ou 0,5 mL de sêmen diluído.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Realização

O estudo foi conduzido, entre maio e junho de 2005, no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situado no município de Viçosa, região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil. O município é localizado a 20°45'45" latitude Sul e 42°52'04" a Oeste de Greenwich, altitude média é de 690 m, temperatura média anual de 20,9 °C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo CWA (inverno seco e verão chuvoso) pela classificação de Köeppen.

3.2. Dados Climáticos

Os dados meteorológicos da localidade de Viçosa-MG, utilizados para realização dessa pesquisa, foram obtidos junto ao 5° Distrito de Meteorologia, pertencente ao Instituto Nacional de Meteorologia.

3.3. Manejo dos animais

Todos os animais que participaram do experimento permaneceram sob o manejo normal do setor. Para as cabras em lactação, o capril conta com instalações do tipo "free stall", formadas por baias de terra batida (com cama sobreposta de serragem), medindo 30m² (6 x 5 m), para uma lotação máxima

de 16 animais, cada baia contendo um solário, de dimensão semelhante. Para as cabritas e cabras não lactantes as instalações são do tipo aprisco, construídos nas encostas dos morros, com o piso ripado, possuindo cada baia um solário, e com uma lotação também para 16 animais.

O manejo nutricional realizado foi o mesmo empregado no setor, para animais em lactação, recria e reprodutores machos. O controle sanitário dos animais foi realizado periodicamente, conforme o esquema pré-estabelecido pelo setor de Caprinocultura da UFV.

3.4. Animais Experimentais

Durante a realização do experimento quatro reprodutores adultos (dois Saanen e dois Alpinos) foram utilizados como doadores de sêmen, com idade média de $21 \pm 7,2$ meses, clinicamente sadios, com qualidade seminal dentro dos padrões exigidos pelo Manual de Andrologia e Avaliação do Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) e, de acordo com os dados reprodutivos do rebanho, comprovadamente férteis. Os machos foram divididos em duas duplas (um Saanen e um Alpino) por turno de coleta. As fêmeas inseminadas, nulíparas, primíparas e pluríparas, pertencentes às raças Saanen e Alpina, e mestiças, obtidas do cruzamento entre as duas raças, foram distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos de acordo com a ordem de manifestação do estro, perfazendo um total de 71 cabras inseminadas durante o período (35 cabras em lactação e 36 cabritas). O critério utilizado para a escolha das cabras lactantes foi o número de dias em lactação (maior ou igual à 60 dias) e, no caso das nulíparas, ter um peso vivo maior ou igual a 30 Kg.

A observação do estro foi realizada diariamente (às 6 e às 16 hs), em todo o rebanho, com auxílio de um rufião devidamente preparado com desvio peniano lateral (POMPERMAYER *et al.*, 1993). De acordo com a ordem de manifestação de estro os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos:

T₁ – Inseminação com sêmen a fresco diluído em citrato-gema;
T₂ - Inseminação com sêmen diluído em citrato-gema e resfriado a 5 °C por 24 horas.

3.5. Manipulação do sêmen

Coleta do sêmen – as coletas foram realizadas diariamente em dois turnos (as 7 e as 17 horas), pela manhã um bode Alpino e um Saanen e a tarde, outros dois bodes das mesmas raças. Desta maneira, a coleta foi feita uma vez por dia em cada animal, produzindo um banco de sêmen fresco e resfriado das duas raças, a cada 12 horas, durante todo o período experimental. Para as coletas de sêmen, os machos foram estimulados por uma fêmea em estro natural, devidamente contida em um tronco. Foi utilizada a técnica da vagina artificial (MEMON e OTT, 1981), com temperatura da água entre 42 e 44 °C.

Análises iniciais - Após a coleta, o sêmen foi encaminhado imediatamente para o laboratório de processamento, e colocado em banho-maria à temperatura de 37 °C. O volume (mL) do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo de coleta graduado. Todo o material para a realização do exame físico permanecia pré-aquecido em mesa aquecedora a 37 °C. As avaliações microscópicas quanto aos aspectos físicos (motilidade e vigor) foram realizadas imediatamente após a coleta. O vigor (escala de 0-5) e a motilidade espermática progressiva (de 0-100%) foram avaliados utilizando o duplo cego, pela observação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula em objetiva de 40x, tal como preconizado pelo COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA (1998). Ejaculados com motilidade espermática progressiva e vigor espermático inferiores a 60% ou 3 respectivamente, foram descartados após a coleta.

Centrifugação – seguindo as análises iniciais, cada amostra foi submetida ao processo de centrifugação, com a finalidade de remover o plasma seminal. Uma solução de ringer-lactato, previamente aquecida a 37 °C, foi adicionada à amostra de sêmen numa diluição de 1:9 (sêmen:ringer) e, em

seguida centrifugado a uma força relativa de 402,5g [calculado por meio da fórmula: RCF (Força Centrífuga Relativa) = RPM^2 (Rotações por minuto) x 1,118 x R (Raio da centrífuga) x 10^{-5}] (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA, 2006), por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o “pellet” formado re-suspendido suavemente em 2,0 mL do meio diluidor (fórmula seguinte). A partir deste momento o sêmen permaneceu na bancada a temperatura ambiente.

Composição do meio Diluidor - O diluidor utilizado durante o experimento foi o citrato-gema (MIES FILHO, 1987) com uma concentração final de 20 % de gema de ovo (v/v). Segundo a seguinte fórmula:

Solução 1:

Citrato de Sódio.....	2,9g
Água Bidestilada (q.s.p).....	100mL

Solução 2:

Solução 1.....	80mL
Gema de ovo.....	20mL
Sulfato de Gentamicina.....	10mg

Cálculo da Concentração espermática, Diluição e envase - para o cálculo da concentração espermática 10 μ L do sêmen re-suspenso foram diluídos em 2,0 mL de solução de formol-salina tamponada. A contagem dos espermatozóides foi feita em um hematocítômetro (Neubauer). O diluidor foi adicionado de modo que a concentração final fosse de 400X10⁶ espermatozóides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL contendo 100 milhões de espermatozóides.

Resfriamento do Sêmen – Após o envase, as palhetas foram usadas nos dois tratamentos: metade permanecia na bancada para a utilização a fresco (T1) e a outra metade foi submetida a uma taxa de resfriamento média entre 0,4 e 0,5 °C/minuto, em um dispositivo mantido na primeira prateleira da geladeira, segundo metodologia descrita por FÜRST *et al.* (2005). A temperatura de 4-5 °C foi atingida por volta de 1 hora após o início do

resfriamento e, respeitando este intervalo, as partidas foram transferidas para um banho-maria mantido à temperatura de geladeira, evitando as oscilações de temperatura quando se abria a porta da mesma.

Exame morfológico e teste hipo-osmótico (hos-t) - Para a análise da morfologia espermática, depositou-se 10 μ L da alíquota da amostra, entre lâmina e lamínula, conforme a técnica da preparação úmida, com a leitura sendo feita por meio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x. Foram observadas 100 células espermáticas. O estudo das anormalidades espermáticas foi baseado na classificação de BLOM (1950) e o resultado expresso em porcentagem de defeitos maiores, menores e totais.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada no sêmen fresco diluído e no sêmen diluído e resfriado, pelo teste hipo-osmótico (HOS-T), segundo KUMI-DIAKA (1993), utilizando 1,0 mL de uma solução com sacarose na concentração de 100 mOsmol, acrescida de 10 μ L de sêmen diluído. Essa solução foi incubada por 30 minutos, em banho-maria a 37 °C. A leitura consistiu em adicionar 10 μ L da amostra entre lâmina e lamínula e a contagem de 100 células, em microscopia de contraste de fase, em aumento de 400x. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda enrolada. O resultado foi determinado em porcentagem de células que responderam com dobramento de cauda ao teste de hipo-osmótico.

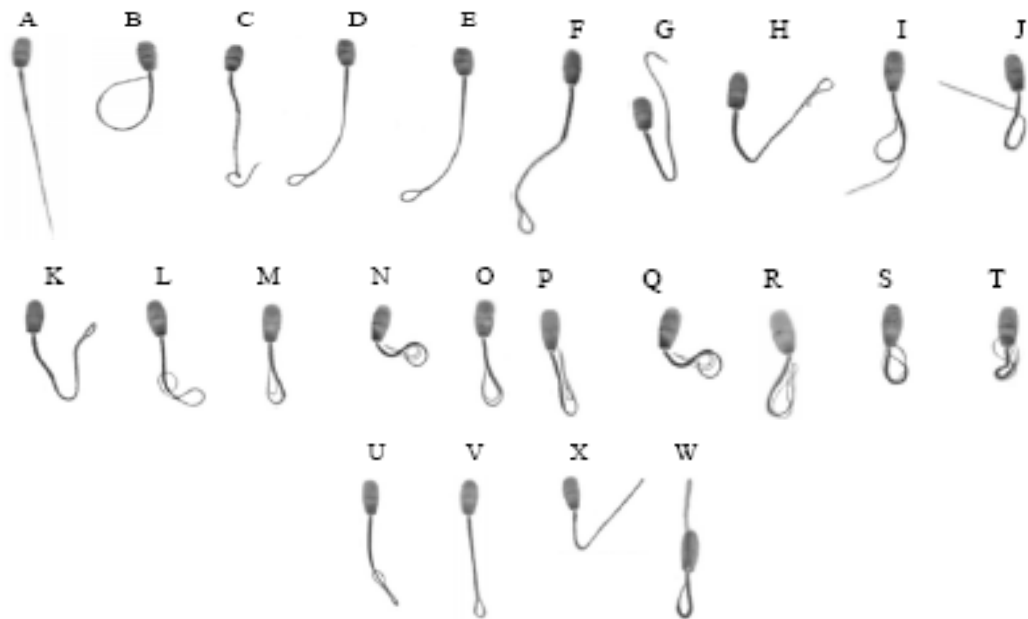


Figura 2. Diferentes formas de dobramento da cauda dos espermatozoides caprinos submetidos ao teste hiposmótico (microscópio de contraste de fase, 1000x). (A) indica espermatozóide normal, (B – J) espermatozoides com a cauda dobrada e (K - W) espermatozoides com a cauda fortemente dobrada. Adaptado de FONSECA *et al.*, 2005.

3.6. Inseminação Artificial

As inseminações seguiram o manejo reprodutivo normal do rebanho, em que todos os animais que manifestam estro, independente do seu histórico reprodutivo, são levados ao bode. Neste caso não foram recusados para a inseminação artificial nenhum dos animais que manifestou estro durante o período.

Todas as cabras receberam duas inseminações com sêmen do mesmo reprodutor, sendo a primeira realizada 12 horas após a detecção do estro e a segunda 24 horas após a primeira inseminação. Cabras em estro pela manhã foram inseminadas à tarde e aquelas que manifestaram estro à tarde foram inseminadas na manhã do dia seguinte. O método adotado foi o da inseminação transcervical segundo AZEVEDO *et al.* (1997b), utilizando para tanto a Bainha de inseminação para ovinos e caprinos, com ponta excêntrica branca (Minitub, Porto Alegre, RS, Brasil) levando-se em consideração o local de deposição do sêmen (intra-cervical profunda ou intra-uterina).

3.7. Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado pelo exame ultra-sonográfico transretal, com transdutor de 5,0 MHz (Ultra-som Aloka, modelo-SSD 500), no dia 23 de julho de 2005. Nesta data os animais estavam entre 30 e 60 dias após a inseminação e, foram registrados como prenhez positiva a observação da vesícula embrionária ou do feto.

3.8. Levantamento Reprodutivo do Rebanho

Foi realizado um levantamento referente à fertilidade dos de acasalamentos ocorridos entre os anos de 2002 e 2005. Para tanto, utilizou-se como fonte de informações o programa de gerenciamento de rebanho do setor de Caprinocultura (RODRIGUES, 2003). Os gráficos foram confeccionados no Office Excel (Microsoft®, 2003), com o intuito de averiguar a flutuação na fertilidade do rebanho ao longo dos anos, bem como, nas diferentes épocas dentro de cada ano.

3.9. Análise estatística

Os dados qualitativos (taxa de gestação) foram analisados pelo teste de Qui Quadrado. Os dados paramétricos, referentes à qualidade do sêmen, foram submetidos à análise de variância, aplicando-se o teste de SNK (Student Newman Keuls) para comparar as médias obtidas com o sêmen fresco e com o sêmen resfriado por 24 horas. Para auxiliar as análises estatísticas utilizou-se o programa SAEG 9.0 (UFV, 2005). O nível de significância estatística adotado foi de 5%, para avaliar o efeito dos tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Condições Ambientais*

O principal fator para o cálculo da luminosidade diária é a latitude. Assim sendo, a distância em relação ao Equador é fundamental para que ocorram grandes divergências no fotoperíodo ao longo do ano. Como Viçosa situa-se a uma latitude de $-20,7625^\circ$ em relação ao Equador, a variação da luminosidade solar ao longo do ano é pequena, variando de 13,23 horas (dia mais longo do ano) a 10,74 horas (dia mais curto do ano), segundo cálculos encontrados em ALLEN *et al.*, 1998. Durante toda a execução do estudo, notou-se discreta redução no número de horas de luz diária (Figura 3). Segundo CURTIS (1983), o que leva as fêmeas caprinas a iniciar e manter uma atividade cíclica ovariana é a percepção de uma luminosidade diária decrescente. Pôde-se constatar, pela constância nas manifestações de ciclos estrais, que os animais ainda permaneciam em estação de acasalamento, corroborando com este autor. RODRIGUES *et al.* (1994), demonstraram que as fêmeas caprinas, criadas na zona da mata Mineira, manifestam ciclos estrais normais no período compreendido entre os meses de março e julho.

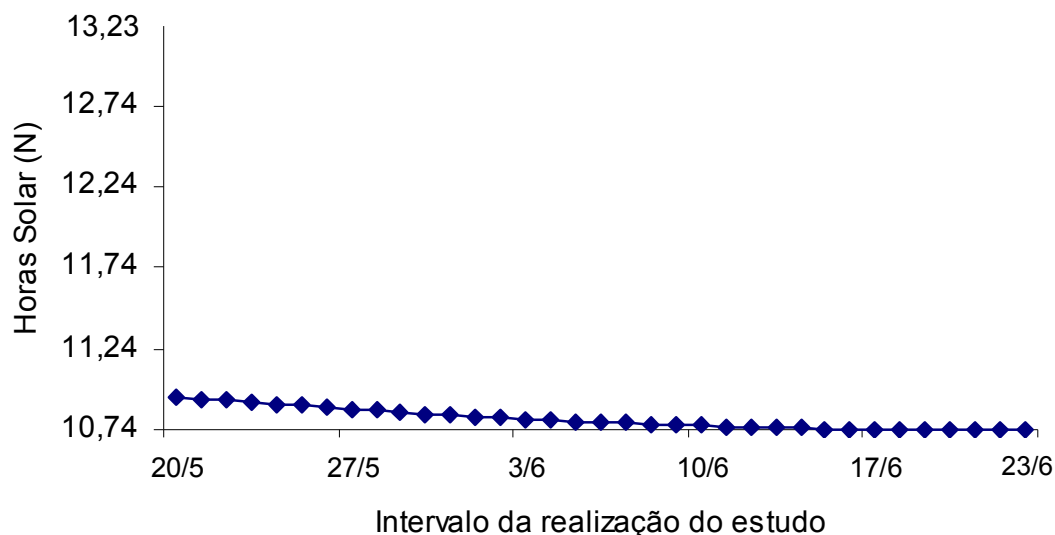


Figura 3 – Número de horas de luz diárias durante a execução do estudo. Segundo ALLEN *et al.*, 1998.

Os dados meteorológicos do município de Viçosa-MG, durante o período experimental, estão demonstrados na tabela 3. As temperaturas máxima e mínima, bem como as suas médias observadas durante a realização do experimento, ficaram dentro da zona de termoneutralidade para caprinos leiteiros. De acordo com a figura 4, a temperatura média de bulbo seco, $17,6 \pm 3,96^{\circ}\text{C}$ (Tabela 3) manteve-se dentro da faixa ótima, fisiológica e de produção, para caprinos de raças leiteiras especializadas. Segundo SANTOS *et al.* (2005), raças de caprinos exóticas (criadas em regiões diferentes daquela de sua origem) demonstram certa adaptabilidade, quando introduzidas em regiões que apresentem condições climáticas semelhantes. As duas raças utilizadas no experimento (Saanen e Alpina) são de origem européia e, certamente não têm problemas de adaptação às temperaturas de outono e inverno do sudeste brasileiro.

Tabela 3. Caracterização climática registrada durante o período experimental.

Parâmetro mensurado	Maió-Junho/2005
Amplitude da Temperatura máxima (°C)	17,6 - 28,7
Média da Temperatura Máxima (°C)	24,0 ± 2,2
Amplitude da Temperatura mínima (°C)	7,6 – 18,0
Média da Temperatura Mínima (°C)	14,0 ± 2,3
Média da Temperatura de bulbo seco (°C)	17,6 ± 4,0
Amplitude da Umidade Relativa Máxima (%)	83,0 – 98,0
Amplitude da Umidade Relativa Mínima (%)	46,0 – 92,0
Média da Umidade Relativa (%)	87,1 ± 13,0
Pluviosidade durante o Período Experimental (mm)	72,5

Fonte: 5° Distrito de Meteorologia do Instituto Nacional de Meteorologia

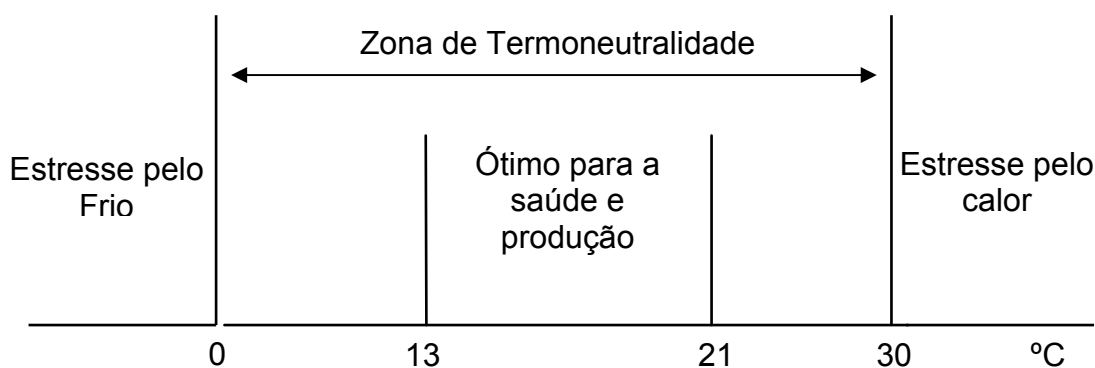


Figura 4. Zona de termoneutralidade e faixa ótima para saúde e produção de caprinos de raças leiteiras especializadas. (Fonte: Smith e Sherman, 1994; Muller, 1982, adaptado de BORGES, 2001).

4.2. Animais Experimentais

Os dados referentes às fêmeas caprinas inseminadas durante o período experimental estão representados na Tabela 4 para cabritas e na Tabela 5 para cabras lactantes.

Tabela 4. Dados zootécnicos das cabritas utilizadas no experimento, seguidos pelo desvio padrão.

Dados das cabritas	Tratamento		Média	CV%
	Fresco	Resfriado		
Número de cabritas IA	16	20		
Idade (meses)	17,0 ± 4,1	16,9 ± 4,4	16,9 ± 4,2	25,20
Moda da idade (meses)	14,0	14,0		
Peso (Kg)	33,4 ± 7,4	31,9 ± 4,5	32,6 ± 5,9	18,26
ECC*	3,0 ± 0,5	3,1 ± 0,4	3,0 ± 0,5	15,6

*ECC (escore médio de condição corporal).

Tabela 5. Dados produtivos e reprodutivos das cabras lactantes utilizadas no experimento, seguidos pelo desvio padrão.

Parâmetros Produtivos e Reprodutivos	Tratamento		CV%
	Fresco	Resfriado	
Número de cabras IA	18	17	
Idade Média (dias)	41,4 ± 17,7	48,2 ± 26,4	50,2
Número médio de Partos	2,6 ± 1,7	3,0 ± 1,4	53,8
Produtividade Média (Litros)	1,9 ± 0,5	1,6 ± 0,6	29,6
Prolificidade Média	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,4	23,8
Dias em lactação	264,6 ± 214,6	185,3 ± 143,7	83,3
Intervalo de Partos (dias)	392,2 ± 96,4	337,9 ± 66,9	51,9
Intervalo do Parto à Concepção (dias)	240,8 ± 96,0	191,4 ± 67,1	37,9
Nº médio de Serviços por Concepção	3,0 ± 1,8	2,6 ± 1,1	51,9

Quanto aos parâmetros que determinam a puberdade em caprinos, como: idade à primeira cobertura; peso vivo e ECC, os animais experimentais ficaram uniformemente divididos entre os tratamentos. Pela Tabela 4, se observa que a média de idade das cabritas inseminadas foi de 16,9 meses, havendo uma concentração de animais com idade de 14 meses, inseminadas quando manifestaram seu primeiro estro.

O escore de condição corporal destes animais quando da inseminação artificial foi considerado bom (ZARAZAGA *et al*, 2005), embora, BORGES e BRESSLAU (2003), considerem como ideal um ECC médio de pelo menos 3,5,

para que os animais pudessem levar a gestação a termo e continuassem seu crescimento normal e ainda chegassem ao parto com reservas para o garantir o início da lactação.

Apesar da aleatoriedade empregada na distribuição dos animais entre os tratamentos (de acordo com a ordem de manifestação do estro), houve uma variação dos animais entre os tratamentos, quanto ao número de dias em lactação, intervalo de partos, intervalo parto-concepção e escore de condição corporal médios dos animais de cada tratamento, porém esta diferença foi não significativa ($P > 0,05$).

O número médio de dias em lactação indica que os animais estavam em condições favoráveis para conceber, tendo passado o período crítico do balanço energético negativo do pós-parto. Entretanto, quando se observa o número médio de serviços por concepção (3,0 e 2,6 para os tratamentos a fresco e resfriado, respectivamente), no histórico reprodutivo dos animais, pode-se questionar a fertilidade das fêmeas utilizadas neste experimento. Além disso, o elevado coeficiente de variação de alguns parâmetros analisados nos mostra a variabilidade encontrada entre as fêmeas em lactação utilizadas no estudo.

4.3. Características Físicas do sêmen

Na Tabela 6 são apresentados os resultados médios de motilidade e vigor, obtidas de sêmen coletados a fresco (0 hora) e, posterior a cada etapa do resfriamento. Os valores encontrados para o sêmen fresco (Motilidade = 85% e vigor = 3,62) estão de acordo com os padrões preconizados para o processamento e utilização do sêmen caprino a fresco ($> 70\%$ e 3, para motilidade e vigor, respectivamente; CBRA, 1998).

Tabela 6. Médias e desvio padrão de Motilidade (%) e Vigor (0-5), encontradas durante o processamento do sêmen durante o período experimental.

Etapa de Resfriamento	Parâmetro	
	Motilidade	Vigor
0 hora	85,0 ± 4,7 ^a	3,6 ± 0,4 ^a
Pós-centrifugado	78,2 ± 5,9 ^b	3,2 ± 0,3 ^b
24 horas	70,9 ± 6,3 ^c	3,0 ± 0,3 ^b
Média	78,2 ± 8,0	3,3 ± 0,4

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença, em nível de 5%

Houve diferença entre a motilidade espermática de cada uma das etapas do processamento ($P < 0,05$), com perdas médias de 6,85 e 7,22 pontos percentuais, durante a centrifugação e o resfriamento, respectivamente. O vigor também foi reduzido com o decorrer do processamento, a uma taxa de 0,38 pontos ($P < 0,05$) na centrifugação e posteriormente, 0,26 no resfriamento ($P < 0,05$), em uma escala de variação de 0 a 5. O processamento como um todo determinou uma queda de 14,07 pontos percentuais na motilidade e 0,64 pontos no vigor, quando comparado ao sêmen recém coletado.

Os estudos de PICKETT *et al.* (1975), com diluição do sêmen e centrifugação, utilizando uma força de centrifugação entre 370 e 829 g por 5 minutos, relataram uma redução nas perdas de motilidade pós-resfriamento ou pós-congelamento em sêmen de eqüinos, desde que uma concentração menor que 10% de plasma seminal estivesse presente. Segundo os mesmos, elementos do plasma seminal (fosfolipídios e proteínas) estão relacionados com a redução na aglutinação de cabeça e aumento na motilidade espermática pós-centrifugação. Quanto a força centrifuga, estes mesmos autores notaram uma tendência para ocorrência de menores motilidades quando o sêmen foi lavado em velocidades superiores a 956 g, e a alteração desta força para valores entre 428 e 956 g, resultava em melhores resultados.

Em bovinos e ovinos a lavagem do sêmen em meio centrifugador com ausência de gema de ovo levou a ocorrência de danos à célula espermática e conseqüente redução da motilidade. Este fato foi explicado pela proteção da célula exercida pela gema de ovo durante o processo de lavagem do sêmen. A

diluição do sêmen antes da lavagem também tem sido relacionada à redução na motilidade, nas espécies bovina e eqüina, e o motivo apontado foi à excessiva diluição do plasma seminal, reduzindo a concentração dos elementos protetores e a perda de material celular pelo espermatozóide, resultando em redução na motilidade.

No presente estudo a significativa redução na motilidade pós-centrifugação (6,85%) pode ter sido em virtude destes fatores. No processamento utilizado o sêmen foi diluído (1:9) antes da centrifugação, em meio Ringer lactato, não enriquecido com gema de ovo. Apesar de haver variações entre espécies, quanto à resistência da célula, a força de centrifugação utilizada parece não ser o principal fator envolvido na queda de motilidade e vigor, pois a intensidade utilizada (402,5 g) foi inferior à citada por outros autores, como de 700 g/ 15 minutos (CABRERA *et al.*, 2005); e de 600 g/ 10 minutos (VIANA *et al.*, 2006).

Quanto à redução destes parâmetros durante o resfriamento, NUNES e SILVA (1984) sustentaram que o sêmen caprino suporta o resfriamento por um período de até 12 horas, sem perder a capacidade fecundante. As perdas na fertilidade do sêmen armazenado por período maior que 12 horas estão vinculadas a queda no pH e acúmulo de produtos de oxidação que reduzem a capacidade fecundante da célula espermática caprina, sendo observados problemas tais como a reação acrossômica prematura, morte espermática e perda de motilidade e vigor. De acordo com MCKINNON (1996), quando as células espermáticas são mantidas a 5 °C ocorre uma redução do metabolismo para valores de 10 % daquele observado nas células a 37 °C de temperatura. Em consequência, a produção de catabólitos é menor e a peroxidação da membrana plasmática será mais lenta, de modo que o desgaste da célula não ocorra tão rápido. Entretanto, o efeito cumulativo destes produtos ao longo de 24 horas pode ter contribuído para as perdas durante o resfriamento.

Os resultados obtidos no pós-resfriamento foram semelhantes aos encontrados por BISPO (2005), que obteve 70% de motilidade e um vigor de 3,17, com 24 horas de armazenamento a 5 °C em meio diluidor citrato com 20% de gema de ovo, utilizando uma curva de resfriamento de 0,5 °C/minuto, semelhante a utilizada no presente, embora este último não realizou a centrifugação do sêmen antes do resfriamento. SIQUEIRA (2006) também encontrou resultados semelhantes ao presente estudo (62,5% de motilidade e

um vigor de 3,38), trabalhando com meio diluidor Tris com 2,5% de gema de ovo, sem centrifugação. Estes autores avaliaram também o sêmen com 12 horas de resfriamento, não observando diferença no tocante a motilidade e vigor, quando comparado aquele armazenado por 24 horas a 5 °C.

VIANA *et al.* (2006), compararam os resultados do sêmen conservado em meio diluidor Tris com 2,5% de gema de ovo (EVANS E MAXWELL, 1987), utilizando ou não a centrifugação previamente. Não encontraram diferenças quanto à motilidade e vigor às 24 horas de resfriamento a 4 °C. Pode-se concluir que o sêmen conservado em meio diluidor contendo alta ou baixa concentração de gema, centrifugado ou não, apresenta resultado de motilidade e vigor semelhante, quando armazenado a 4 °C por um período de 24 horas.

Pela Tabela 7 observa-se que os reprodutores com motilidade e vigor, mais elevados, no início do processamento (tempo 0), mantiveram estes parâmetros maiores durante todo o processo. Os processos de centrifugação e resfriamento determinaram queda na motilidade e vigor espermático do sêmen de todos os reprodutores ($P < 0,05$).

Tabela 7. Médias e desvio padrão de Motilidade e vigor do sêmen recém coletado (0 horas) e pós-centrifugado, para ambos os tratamentos e após 24 horas para o tratamento resfriado.

Etapa	Parâmetro	Reprodutor			
		1 (S*)	2 (A*)	3 (S)	4 (A)
0 horas	Motilidade	86,9 ± 2,8 ^a	81,8 ± 5,6 ^b	85,3 ± 5,0 ^a	85,6 ± 3,8 ^a
	Vigor	3,7 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4
Pós-Centrifugado	Motilidade	80,9 ± 4,2 ^a	76,1 ± 6,4 ^b	78,1 ± 5,3 ^b	77,4 ± 6,7 ^b
	Vigor	3,3 ± 0,3 ^a	3,1 ± 0,3 ^b	3,3 ± 0,4 ^a	3,3 ± 0,3 ^a
24 horas	Motilidade	73,5 ± 3,7 ^a	68,3 ± 7,1 ^b	71,7 ± 7,7 ^{ab}	70,2 ± 5,5 ^{ab}
	Vigor	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,2

^{a,b} – Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem ao nível de 5% de probabilidade (Teste SNK)
S – Saanen; A – Alpino.

O reprodutor 2 apresentou menor motilidade pós-resfriamento, quando comparado ao animal de número 1. Uma vez que, as taxas de queda da motilidade, durante as etapas do processamento, foram semelhantes para

estes reprodutores (6,0 e 5,7 durante a centrifugação e, 7,4 e 7,8 durante o resfriamento e armazenamento, para os animais 1 e 2, respectivamente), a diferença se deve a menor motilidade inicial do sêmen do reprodutor 2. Já os reprodutores 3 e 4 apresentaram maiores quedas no processo de centrifugação, quando comparados ao 1, podendo este fato ser causado pela menor resistência do sêmen destes reprodutores ao estresse sofrido durante a lavagem (PICKETT, 1975).

A tabela 8 relaciona os parâmetros seminais avaliados de cada bode nos dois tratamentos, sêmen a fresco e resfriado. Os resultados do teste de reação hiposmótica foram semelhantes entre os reprodutores, bem como entre os diferentes tratamentos ($P>0,05$). Segundo BISPO (2005), estes resultados estão provavelmente relacionados à grande variabilidade encontrada durante a leitura das amostras, não permitindo que diferenças sejam encontradas neste teste complementar. No presente estudo a variação foi elevada, corroborando os resultados deste autor.

Tabela 8. Médias de Motilidade, vigor, resposta ao teste de hiposmótico (Host.), seguidas do desvio padrão, de cada reprodutor nos diferentes tratamentos (fresco e resfriado).

Tratamento		Reprodutor			
		1 (S)	2 (A)	3 (S)	4 (A)
Fresco	Motilidade	86,9 ± 2,8 ^a	81,8 ± 5,6 ^b	85,3 ± 5,0 ^a	85,6 ± 3,8 ^a
	Vigor	3,7 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4
	Host.	88,6 ± 8,7 (26)*	56,2 ± 17,3 (24)	77,1 ± 12,3 (26)	64,8 ± 20,1 (25)
Resfriado	Motilidade	73,5 ± 3,7 ^a	68,3 ± 7,1 ^b	71,7 ± 7,7 ^{ab}	70,2 ± 5,5 ^{ab}
	Vigor	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,2
	Host.	88,2 ± 6,9 (21)	56,0 ± 13,9 (23)	67,3 ± 15,8 (23)	51,8 ± 18,5 (25)

^{a,b} Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa, em nível de 5% (teste SNK);

* () Valor de observações que gerou cada média do teste hiposmótico.

Foram realizados exames de patologia espermática, em preparação úmida, do sêmen a fresco de todos os ejaculados. Os índices de patologia maior e menor ficaram abaixo dos níveis preconizados para o sêmen caprino

(Manual de Andrologia e Avaliação do Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, 1998) e são apresentados nos Anexos 1 e 2.

4.4. Fertilidade das cabras inseminadas

Os dados zootécnicos, o comportamento de estro das cabritas e cabras inseminadas e a qualidade do sêmen, além da taxa de concepção conseguidos, em cada um dos tratamentos, estão relacionados na tabela 9.

Tabela 9. Dados relacionados às cabritas e cabras inseminadas, ao sêmen utilizado em cada inseminação e conseqüente taxa de concepção, em cada um dos tratamentos.

Parâmetros Avaliados	Cabritas		Cabras	
	Fresco	24 horas	Fresco	24 horas
Nº de animais IA	16	20	18	17
Idade (meses)	17,0 ± 4,10*	16,9 ± 4,40	41,4 ± 17,74	48,2 ± 26,40
Escore corporal (1-5)	3,0 ± 0,50	3,1 ± 0,44	1,8 ± 0,38	2,2 ± 0,65
Peso (Kg)	33,4 ± 7,36	31,9 ± 4,53	54,3 ± 8,32	55,6 ± 8,07
Duração do Estro (h)	32,3 ± 8,45	32,7 ± 6,30	37,7 ± 12,14	32,8 ± 8,51
Início do Estro à 1ª IA (h)	12,0 ± 0,00	12,3 ± 1,34	13,0 ± 2,30	12,4 ± 1,45
Motilidade 1ª IA (%)	78,1 ± 5,12 ^a	69,5 ± 7,41 ^b	80,3 ± 6,05 ^A	70,0 ± 8,84 ^B
Vigor 1ª IA (1-5)	3,3 ± 0,31 ^a	3,1 ± 0,41 ^a	3,3 ± 0,30 ^A	3,0 ± 0,21 ^B
Host 1ª IA (%)	68,0 ± 17,65	54,8 ± 23,10	70,7 ± 12,84	62,8 ± 21,33
Início do Estro à 2ª IA (h)	36,0 ± 0,00	36,3 ± 1,34	37,0 ± 2,30	36,4 ± 1,45
Motilidade 2ª IA (%)	78,8 ± 6,45 ^a	70,3 ± 5,73 ^b	79,7 ± 5,80 ^A	69,7 ± 7,80 ^B
Vigor 2ª IA (1-5)	3,3 ± 0,31	3,1 ± 0,46	3,4 ± 0,40 ^A	2,9 ± 0,24 ^B
Host 2ª IA (%)	69,3 ± 12,88	55,5 ± 23,58	69,3 ± 18,99	67,7 ± 23,17
Taxa de concepção (%)	31,3% (5/16)	20,0% (4/20)	44,4% (8/18)	17,7% (3/17)

^{a,b} Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças para cabritas (P<0,05)

^{A,B} Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças para cabras (P<0,05)

* Valores médios seguidos pelos respectivos desvios padrões.

O sêmen utilizado nas inseminações de cabritas e cabras apresentou parâmetros qualitativos semelhantes, observando-se uma redução de aproximadamente 10% na motilidade e 0,4 pontos no vigor, do sêmen submetido a 24 horas de resfriamento, quando comparado ao sêmen a fresco (Tabela 9). Os resultados de hiposmótico não diferiram entre o sêmen utilizado a fresco e o resfriado, não sendo observada uma correlação entre o teste de hiposmótico e a fertilidade das cabras inseminadas ($P>0,05$).

As taxas de gestação encontradas no presente estudo, foram as seguintes: 31,3 e 20,0% para cabritas e, 44,4 e 17,7% para cabras, nos tratamentos a fresco e resfriado, respectivamente ($P>0,05$). Segundo AZEREDO *et al.* (1995), o efeito da categoria reprodutiva (no caso novilhas) sobre a taxa de concepção está relacionado ao grau de dificuldade na transposição do cérvix. A influência do local de deposição do sêmen no trato genital feminino (TGF) sobre a taxa de gestação varia de acordo com a concentração da dose inseminante e com a motilidade progressiva dos espermatozoides, pois estes fatores determinam o número de espermatozoides viáveis no local da fecundação. No presente estudo, somente duas cabritas receberam uma segunda inseminação intra-cervical, por já se encontrarem fora do estro e com a cérvix fechada, o restante dos animais receberam ambas as inseminações intra-uterinas, não sendo, o local de deposição do sêmen, um fator de variação para os resultados obtidos. A concentração de 100×10^6 células espermáticas móveis, antes do resfriamento, garantiu, de acordo com a taxa de recuperação, um mínimo de 90×10^6 células móveis, por palheta, pós-resfriamento. Conferindo um total de 180×10^6 espermatozoides móveis por dose inseminante, nas duas inseminações, o que são mais que suficientes para promover a fecundação (CBRA, 1998).

De acordo com a duração média do estro das cabritas, 32,3 e 32,7 horas, para o tratamento a fresco e resfriado, respectivamente, a segunda inseminação (36,0 e 36,3 horas após o início do estro) aconteceu com os animais já fora do estro. Segundo HAFEZ e HAFEZ (2004), a ovulação ocorre no final ou após o estro. Neste caso, a segunda inseminação se justificaria, por proporcionar uma maior sincronia entre os gametas. Apesar disso, a primeira inseminação ocorreu em média 20 horas antes do final do estro e a segunda cerca de 4 horas após o final do estro, podendo indicar uma assincronia entre o momento da ovulação e a inseminação.

Já entre as cabras, a duração do estro foi de 37,7 e 32,8 horas, respectivamente, para as inseminadas com sêmen fresco e resfriado, respectivamente ($P>0,05$). Sendo as primeiras inseminadas às 0,7 horas do final do estro e as últimas, 3,5 horas após o final do estro, portanto, mais próximas do terço final do estro e, do momento da ovulação.

Segundo EVANS e MAXWELL (1987), os espermatozoides sobrevivem no útero e oviduto por 10-12 horas e a sobrevivência do óvulo varia de 12 a 24 horas. Desta forma, considerando-se a ovulação no final do estro, em ambos os tratamentos e categorias, a segunda inseminação permitiria um encontro entre os gametas em um período adequado para a fecundação.

Resultados superiores foram encontrados por BORGHAIN *et al.* (1985), com uma taxa de concepção de 61,11%, utilizando sêmen conservado por 48 horas em meio diluidor citrato-gema, quando processou a inseminação no terço final do estro (24-36 horas). SIQUEIRA (2006), somando os tratamentos com 12 e 24 horas de conservação do sêmen, conseguiu 64,29 e 54,55% de gestação com cabras lactantes e cabritas, respectivamente, procedendo a uma única inseminação no terço final do estro. Este último autor utilizou um diluidor à base de Tris-gema, sendo que a concentração de gema de ovo foi de 2,5%, muito inferior à utilizada no presente estudo (20%). No entanto, a concentração de gema, no presente estudo, não afetou a motilidade e vigor espermático do sêmen a fresco e nem do resfriado 24 horas, sendo constatados pelos resultados semelhantes aos obtidos por BISPO (2005) e SIQUEIRA (2006).

Tabela 10. Resultado da fertilidade das categorias de fêmeas utilizadas, recebendo sêmen fresco ou resfriado.

Sêmen	Categoria	n	Taxa de Gestação (%)
Fresco	Cabra	18	44,4
	Cabrita	16	31,3
	Total	34	38,2
Resfriado	Cabra	17	17,7
	Cabrita	20	20,0
	Total	37	18,9
Total	Cabra	35	31,4
	Cabrita	36	25,0
	Total	71	28,2

Mesmo após o somatório das categorias (Tabela 10), não foi observado efeito do tratamento, fresco e resfriado, sobre a fertilidade dos animais após a inseminação ($P>0,05$). Como ambos os tratamentos só diferiram quanto ao resfriamento e período de armazenamento, a ação em conjunto destes dois fatores pode ter contribuído para a obtenção destes resultados. SIQUEIRA (2006), também observou, numericamente, um pior resultado com o sêmen conservado por 24 horas (42,9%), quando comparado ao de 12 horas (55,6%). Estes resultados estão de acordo com NUNES e SILVA (1984), que encontraram uma redução na capacidade fecundante do sêmen armazenado por um período superior a 12 horas, chegando ao limite de alterações morfológicas com 24 horas de armazenamento. PALOMINO *et al.*, (2001), sugeriram que estas alterações fossem causadas pelo acúmulo de produtos tóxicos as células, provenientes do metabolismo espermático ocorrido durante o período de armazenamento.

Duas inseminações são geralmente aceitas, como método de aumentar a fertilidade. Entretanto, RITAR (1993) assume que duas inseminações não aumentam a fertilidade, quando o total de espermatozoides depositados em uma única inseminação seja no mínimo 120×10^6 . Dessa maneira, no presente estudo a dose inseminante total foi de 200×10^6 de espermatozoides viáveis, podendo não ser o motivo. Entretanto, alguns autores (CORTEEL *et al.*, 1988; RITAR e BALL, 1993, citados por ROCA *et al.*, 1997) encontraram baixa fertilidade após duas inseminações e sugeriram que pode ter sido resultado do estresse adicional pela manipulação dos animais e, provavelmente pequeno ou nenhum ganho pode ser obtido com uma segunda inseminação, se a primeira foi realizada em momento ideal. O mecanismo que pode estar envolvido nesse processo é a interferência do estresse adicional da segunda inseminação sobre as contrações uterinas, alterando o transporte dos espermatozoides até os ovidutos (EVANS e MAXWELL, 1987). CORTEEL *et al.* (1988), associaram o efeito negativo dos corticóides, liberados em situações de estresse, sobre a função reprodutiva dos animais, como o fator principal para o pior resultado encontrado com duas inseminações.

Somando-se as inseminações com sêmen fresco e resfriado, em cada categoria animal, cabra e cabrita, as taxas de concepções foram semelhantes ($P>0,05$) (Tabela 10). O menor valor encontrado para as cabritas pode ser pelo início da atividade reprodutiva, quando da execução do experimento, fato este,

acompanhado pela manifestação de ciclos curtos (fator não avaliado no presente estudo) e pela baixa de fertilidade animal, quando submetidos ao acasalamento ou inseminação artificial.

Outro a ser levado em consideração na avaliação da fertilidade das cabritas, foi o peso médio destes animais ao receberem os devidos tratamentos. O peso médio das cabritas inseminadas foi de 33,4 kg, e 31,9 kg ($P>0,05$), para o sêmen fresco e resfriado, respectivamente. De acordo com o manejo adotado no setor, os animais com peso igual ou superior a 30 kg estão aptos para serem cobertos. Segundo *LEBOUEF et al.* (1998) (Tabela 1), a idade à puberdade e os melhores resultados com inseminação artificial em cabritas pode ser um somatório dos efeitos de idade e de peso (idade maior do que 8 meses e peso entre 33 e 50 kg).

EPSTEIN e HERZ (1964), citado por *BORGES e BRESSLAU* (2003), relataram que raças caprinas nativas de uma região ou importadas, quando criadas sob as mesmas condições de nutrição, em um clima subtropical, concebem pela primeira vez, em média, com um ano de idade, desde que sejam nascidas entre o final do inverno e início da primavera. No presente estudo, houve uma concentração de cabritas inseminadas com idade de 14 meses (Tabela 4). Estas cabritas nasceram no início da estação reprodutiva do ano anterior (março e abril, no final do verão e início do outono, respectivamente) e, de acordo com *RIBEIRO* (1997), deveriam atingir a maturidade sexual (12 meses de idade) e estarem aptas para a reprodução no início da estação consecutiva. O nascimento em meses mais frios pode ter comprometido o desenvolvimento normal destes animais, fazendo com que o peso mínimo para serem inseminadas (*LEBOUEF et al.*, 1998), só fosse alcançado nos meses de maio e junho, no final da estação reprodutiva, período onde os fatores ambientais levam a uma menor fertilidade.

4.5. Dados de fertilidade do setor de Caprinocultura (DZO/UFV)

Foram recuperados os dados de acasalamento e fertilidade dos animais do setor de caprinocultura da UFV, referentes aos anos de 2002, 2003, 2004 e o primeiro semestre do ano de 2005 (ocasião da realização deste estudo),

como tentativa de entender os resultados conseguidos com a inseminação artificial do presente estudo.

O gráfico 1 mostra a distribuição dos acasalamentos ao longo do ano. É possível notar a concentração das coberturas durante a estação de monta, meses de março, abril, maio, junho e início de julho. A elevação no número de coberturas que ocorre nos meses de novembro e dezembro se deve a indução pela luz, sendo que o tratamento com luz iniciou-se em julho, permanecendo por dois meses (até setembro) e dois meses após a retirada da luz os animais voltaram a ciclar (novembro e dezembro). Os acasalamentos ocorridos nos demais meses (período de ausência da atividade cíclica ovariana) são decorrentes da atividade experimental de indução hormonal ao estro.

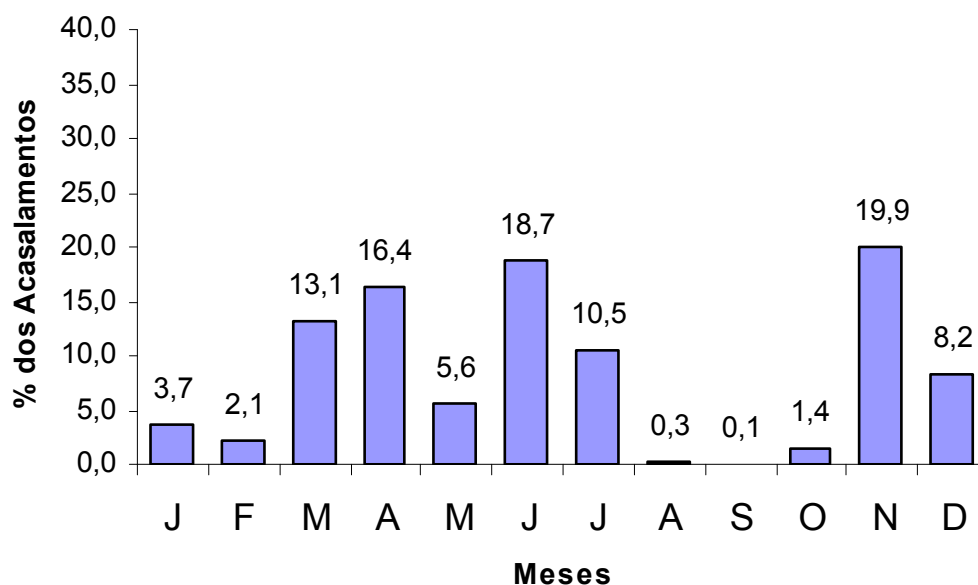


Gráfico 1. Distribuição dos acasalamentos (Monta controlada) ao longo dos meses, referente aos anos de 2002, 2003, 2004 e primeiro semestre de 2005. (Fonte: Setor de Caprinocultura DZO/UFV).

A fertilidade do rebanho ao longo destes anos está representada no gráfico 2, que apresenta uma distribuição em meses. Apesar da elevada fertilidade encontrada durante o mês de agosto (66,7%), este índice foi resultado de somente 0,3% das coberturas (Gráfico 1), não sendo representativo diante do número total de coberturas (n=1124). O restante dos

números indica uma fertilidade média do rebanho de 52,8%, ao longo dos anos estudados.

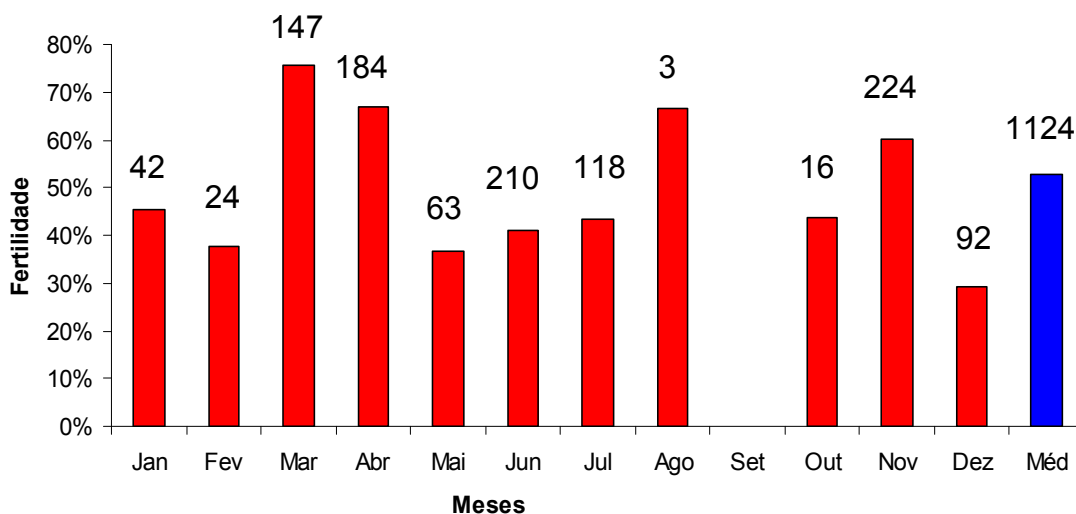


Gráfico 2. Distribuição da fertilidade dos acasalamentos por meses e a fertilidade média do rebanho, referente aos anos de 2002, 2003, 2004 e primeiro semestre de 2005. Os valores nas colunas indicam o número de acasalamentos em cada mês (Fonte: Setor de Caprinocultura DZO/UFV).

Mesmo permanecendo dentro da estação natural de acasalamento, com manifestações de ciclos estrais naturais (GONÇALVES, 2002), os meses de maio, junho e julho (final da estação reprodutiva), apresentaram uma fertilidade inferior quando comparada aos meses de abril, março (início da estação reprodutiva) e novembro (estação induzida pela luz) (Anexo 3). Este fato pode ser explicado pela concepção dos animais mais férteis no início de cada estação reprodutiva, ficando para o fim aqueles animais que não conceberam nas primeiras coberturas, animais repetidores. O gráfico 3 comprova esta alegação, representando de forma clara o número de coberturas necessárias para cada concepção durante os referidos meses. No final das estações reprodutivas (maio, junho e julho, bem como dezembro para a estação induzida) é marcado por um maior número de serviços para cada concepção. Além disso, o final da estação registra temperaturas abaixo daquelas encontradas no início da estação, o que, juntamente com os problemas de

umidade excessiva e de ventos fortes, pode ter contribuído para a menor fertilidade dos animais nestas épocas.

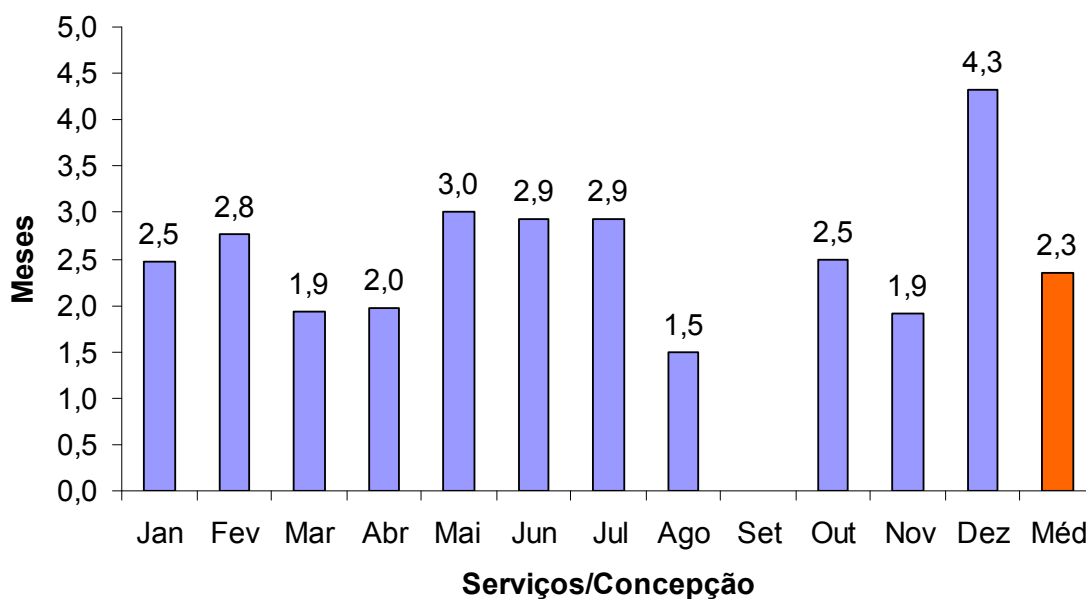


Gráfico 3. Distribuição do número de serviços por concepção, de acordo com os meses em que aconteceram os acasalamentos e a média para o rebanho, nos anos de 2002, 2003, 2004 e primeiro semestre de 2005 (Fonte: Setor de Caprinocultura DZO/UFV).

A fertilidade geral do estudo foi de 28,2% (n = 71), entre os meses de maio e junho de 2005, ficando abaixo daquela observada no capril, na mesma época, durante os anos de 2002, 2003, 2004 e 2005, que foi de 39,9% (n=321) (dados de monta controlada). Considerando somente a inseminação a fresco, a taxa de concepção (38,2%, n = 34) foi semelhante àquela observada no rebanho (Tabela 11). Já o tratamento utilizando sêmen resfriado (18,9%, n = 37) mostrou uma fertilidade inferior à média do rebanho na mesma época do ano.

Tabela 11. Resultado da fertilidade das categorias de fêmeas utilizadas, recebendo sêmen fresco ou resfriado, comparando com a fertilidade observada no rebanho.

Categoria	Sêmen	n	P	Taxa de Gestação
Cabra+cabrita	Fresco	34		38,2
Cabra+cabrita	Resfriado	37	0,07	18,9
Total geral		71		28,2
Rebanho		273		39,9

Não houve diferença estatística entre os tratamentos, pelo teste de Qui-Quadrado em nível de 5%.

Os resultados corroboram os de CORTEEL *et al.* (1988), que encontraram uma fertilidade insatisfatória (52,7%, n=2231), utilizando inseminação com sêmen resfriado e armazenado por poucas horas, quando comparada à fertilidade normal do rebanho, durante a estação de acasalamento. Estes autores associaram este fato à alta incidência de ciclos anovulatórios durante este período, em contrapartida, uma maior proporção de fêmeas ovulando foi observada em cabras tratadas com hormônios para sincronizar o estro. Melhores resultados (59,7% de 1177 cabras inseminadas) foram encontrados nessas últimas quando inseminadas com sêmen resfriado.

Resultados superiores, conseguidos por outros autores (SIQUEIRA, 2006; ROCA *et al.*, 1997), como citado anteriormente, estão possivelmente vinculados à época mais propícia para a realização da inseminação, assim como a uma melhor seleção de fêmeas com maior potencial reprodutivo, tornando-se de grande relevância a observação da fisiologia normal da cabra no momento da inseminação. Além disso, a concentração de gema de ovo utilizada por esses autores (2,5 e 12%, respectivamente) foi inferior à utilizada no presente estudo (20%). Apesar de não ter influenciado a motilidade espermática pós-resfriamento, a concentração de gema ainda é passível de mais estudo, principalmente a respeito da viabilidade do sêmen nos órgãos reprodutivos da fêmea, e possíveis mecanismos envolvendo uma ativação precoce da reação acrossômica, em presença de cálcio e subprodutos da degradação da gema de ovo.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo não encontrou diferenças na taxa de concepção para o sêmen diluído em Citrato-Gema com 20% de Gema de ovo e utilizado a fresco ou resfriado e armazenado por 24 horas a 5°C. No entanto, a fertilidade do sêmen resfriado ficou abaixo daquela obtida com a monta controlada no final da estação reprodutiva natural.

Fatores climáticos, ambientais e de manejo, além da qualidade zootécnica dos animais em relação ao final da estação reprodutiva, podem ter contribuído para as baixas fertilidades encontradas no presente estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R.G.; PEREIRA, L.S.; RAES, D.; SMITH, M. *Crop Evapotranspiration: Guidelines for computing crop water requirements*. In Irrigation and Drainage Paper 56, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, chapter 3, 1998;
- AMOAHA, E. A.; GELAYE, S. Biotechnological advances in goat reproduction. *Journal Animal Science*. Vol. 75: 578-585, 1997;
- AZEVEDO, H.C.; MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Franqueamento cervical e taxa de concepção em cabras Moxotó inseminadas artificialmente com diferentes doses inseminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995: Belo Horizonte. *Anais...* 1995;
- AZEVEDO, H.C.; MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O. Influência do genótipo, da condição reprodutiva e do inseminador no desempenho e na fertilidade da inseminação artificial transcervical em cabras leiteiras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.2, p.145-148, 1997b;
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*. Vol. 82-83: 255-266, 2004;
- BISPO, C. A. S. Avaliação “*in vitro*” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2005;

- BITTENCOURT, R. F.; FILHO, A. L. R.; SANTOS, A. D. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G. A.; VASCONCELOS, M. F.; LEANDRO, E. E. S.; GUIMARÃES, J. D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. *Ciências Animal Brasileira*, Vol. 6, nº. 3, p. 213-218, 2005;
- BLOM, E. The evaluation of bull semen with special reference to its use in artificial insemination (trans). Copenhagen: Montensen, 1950. 89p. (Tese, Doutorado em Medicina Veterinária);
- BORGES, C.H.P. Planejamento de instalações para caprinos leiteiros. In: SEMANA ACADÊMICA DA FMVZ – USP, 11, Pirassununga, 2001. Anais... Pirassununga:FMVZUSP,2001;
- BORGES, C. H. P. e BRESSLAU, S. Manejo e alimentação de cabras em lactação. In: Treinamento em Gado Leiteiro – PURINA Agribands do Brasil, Belo Horizonte, MG, Março de 2003;
- BOYD, E. N.; PERKINS, J. R. OLDS, D. The longevity of bovine spermatozoa in chemical and heat-treated pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, v. 37, p. 650, 1954.
- BRONSON, F. H. Energy balance and ovulation: small cages versus natural habitats. *Reproduction Fertility and Development*. Vol. 10: 127-137, 1998;
- CABRERA, F.; GONZÁLEZ, F.; BATISTA, M.; CALERO, P.; MEDRANO, A.; GRACIA, A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 40, p.191, 2005;
- CAMPOS, A. C. N.; FERREIRA, M. A. L.; PINHEIRO, J. H. T.; MONTEIRO, A. W. U.; FIGUEIREDO, E. L.; NUNES, J. F. Resfriamento a +4°C do sêmen caprino diluído em água de coco. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Vol. 25 (3): 430-431, 2001;
- CHEMINEAU, P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. I. Female oestrous behaviour and ovarian activity. *Reproduction nutrition and Development*. Vol. 26 (2A): 441-452, 1986;

- CHEMINEAU, P., COGNIÉ, Y., GUÉRIN, Y., et al. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome: Italy, 222 p., 1991;
- CHEMINEAU, P.; DAVEAU, A.; MAURICE, F. Effects of tropical photoperiod on sexual activity of Alpine goats. In: IV INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS. 1987. Brasília, DF. Proceedings... Brasília: Goat International Society 1987, p. 269;
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal. 2.ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 1998,49p;
- CORTEEL, J. M. Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. *In: V Internacional Conference on Goats, New Delhi Pre-Conference Proceeding Invited Papers. Vol. II, part II. P 290. Everest Press, A791/1, Amar Puri, Nabi Kabi Karim, Delhi, Índia, 1992;*
- CORTEEL, J.M.; LEBOEUF, B.; BARIL, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum. Res.*, v.1, p.19-35, 1988;
- CURTIS, S.E. Environment and animal function and performance – in *Environmental, Management in animal agriculture - The Iowa States University Press*, chapter 14, p.155-163, 410p; 1983;
- DAUZIER, L. Artificial insemination in the goat. In: Dalling (Ed.), *Int. Encyclopedia of Veterinary Medicine*. W. Green and Soon, p. 269-271, 1966;
- DELGADILLO, J. A.; FLORES, J. A.; VILLARREAL, O.; FLORES, M. J.; HOYOS, G.; CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B. Length of postpartum anestrus in goats in subtropical Mexico: Effect of season of parturition and duration of nursing. *Theriogenology*. Vol. 49: 1209-1218, 1998;
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths Pty Limited, Australia, 194 p., 1987;
- FERNANDEZ-ABELLA, D.; PREVE, M. O.; VILLEGAS, N. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*. Vol. 60: 21-26, 2003;

- FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction*. Vol. 2, nº. 2: 139-144, 2005;
- FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F.; ROVAY, R.; BORGES, A. M.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V. V.; FRAGA, D. B. M. The hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Vol. 25: 436-438, 2001 (abstract);
- FRASER, L.R. and McDERMOTT, C. A. Ca⁺²-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca⁺²-ATPase. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 96: 363-377, 1992;
- FÜRST, R.; CARVALHO, G. R.; FÜRST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Vol. 57, n.5, p.599-607, 2005;
- GAO, D. e CRITSER, J. K. Cryobiology of embryos, germ cells, and ovaries. *ILAR Journal*. Vol. 41 (4), 2000;
- GONÇALVES, H. C. Fatores genéticos e de meio em algumas características produtivas e reprodutivas de caprinos. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa, 1996. 141 p. (Tese Doutorado em Zootecnia);
- GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Varela editora e Livraria LTDA, São Paulo, 340p, 2002;
- GORDON, I. Controlled reproduction in sheep and goat. Wallingford (UK): CAB International, 1997. Cap. 13 Artificial control of oestrus and breeding activity in goats: p. 374-415;
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion sêmen and it's relation to fertiliy. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v.12, p.119-130, 1996;
- HAENLEIN, G. F. W. Past, Present, and Future Perspectives of Small Ruminant Dairy Research. *Journal Dairy Science*. V 84, p. 2097-2115, 2001;

- HAFEZ, E.S.E e HAFEZ, B. Reprodução Animal, 7.ed. São Paulo, Manole, 2004;
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. J. Roy. Microsc. Soc., v.76, p.84;
- HOSSAIN, A. M.; RIZK, B.; BARIK, S.; HUFF, C.; THORNEYCROFT, I. H. Time course of hipo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. Human Reproduction. Vol. 13, 1578-1583, 1998;
- IRITANI, A.J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. Proceedings, Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry Kyoto University, p.97-104, 1961;
- JAMES, A. N. Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. A Dissertation submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Interdepartmental Program of Animal and Dairy Sciences, 2004;
- JEYENDRAN, R. S.; Van der Ven, H. H.; Perez-Pelaez, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 70, 219-228, 1984;
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hyposmotic test. Theriogenology, v.39, p.1279-1289, 1993;
- LEBOEUF, B.; Le VERN, Y.; FURSTOSS, V.; KERBOEUF, D.; GUILLOUET, P.; MAGISTRINI, M. Response of goat sperm to hypoosmotic steps modeled probit analysis. Animal Reproduction Science. Vol. 91(3-4), 265-274, 2005;
- LEBOEUF, B.; GUILLOUET, Ph.; BATELLIER, F.; et al. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. Theriogenology. V. 60, p. 867-877, 2003;

- LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science*. Vol. 55: 193-203, 1998;
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. Vol. 62: 113-141, 2000;
- MEMON, M.A.; OTT, R.S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World Rev. Anim. Prod.*, v.17, p.19-25, 1981;
- MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Austr. Equine Vet. J.*, v.14, p. 146-175, 1996;
- MIES FILHO, A. Inseminação Artificial. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v.2, 434p;
- NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; FLORES, M.; MIRAGAYS, M. H.; GONZALEZ, E.; AGÜERO, A.; The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*. Vol. 32, 351-355, 2000;
- NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGÜERO, A.; Hipoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 51, 721-727, 1999;
- NUNES, J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONÇALVES, D. B. P.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2001. p. 111-125;
- NUNES, J.F.; FELICIANO SILVA, A.E.D. Tecnologia do sêmen resfriado em caprinos, *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.8, n. 2, p. 121-127, 1984.
- NUTRIENT REQUIREMENTS OF DOMESTIC ANIMALS. Nutrient Requirements of Goats: Angora, Dairy, and Meat Goats in Temperate and Tropical Countries. Number 15. NATIONAL ACADEMY PRESS, Washington, D. C., 91p, 1981;

- PALOMINO, L. T.; CAMACHO, J. S.; HUANCA, W. L.; FALCÓN, N. P. Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema. *Rev. Inv. Vet. Perú.* Vol. 12, Nº 1, 2001;
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992;
- PELLICER, M. T. Purificación y caracterización del componente de la secreción bulbouretral de macho cabrio implicado en el deterioro de la cávida de los espermatozoides diluidos en leche. In: Tesina de Licenciatura. Universidad de Murcia, 1995. 200 p;
- PICKETT, B. W.; SULLIVAN, J. J.; BYERS, W. W.; PACE, M. M.; REMMENG, E. E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertile Steril.* Vol. 26 (2): 167-174, 1975;
- POMPERMAYER, L. G.; BORGES, A. P. B.; ESPESCHIT, C. J. B.; NEVES, M. T. D. Preparo de rufiões caprinos pela técnica do transplante do ostio prepucial para a prega inguinal.. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 45, p. 305-313, 1993;
- REVELL, S. G.; MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science.* Vol. 36:77-86. 1994;
- RIBEIRO, A. C.; LUI, J. F.; QUEIROZ, S. A.; RIBEIRO, S. D. A.; RESENDE, K. T. Genetics and enviromental effects on milk yield of Saanen goats in brazilian southeast. In: NATIONAL CONGRESS OF GENETICS, 1996, Caxambu. *Anais*, 1996;
- RIBEIRO, A. C. Estudo dos efeitos genéticos e de ambiente sobre características de importância econômica em caprinos da raça saanen. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista, 133p, 1997 (Tese de Mestrado em Zootecnia);
- RITAR, A. J. Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* Vol. 33: 807-820, 1993;

- RIVERA, G. M.; ALANIS, G. A.; CHAVES, M. A.; FERRERO, S. B.; MORELLO, H. H. Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Ruminant Research*. Vol. 48: 109-117, 2003;
- ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research*. Vol. 25: 147-153, 1997;
- RODRIGUES, M. H., FONSECA, F. A., ESPESCHIT, C. J. B., RODRIGUES, M. T. Efeito da Manipulação do Fotoperíodo na Indução do Estro em Cabras Leiteiras Mestiças. *Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Vol. 23, Nº 6, pp. 909-915, 1994;
- RODRIGUES, M.T. Capricornius - Sistema para o gerenciamento de rebanho caprino; CONG. BRAS. DA SOC. BRAS. DE INFORMÁTICA APLICADA À AGROPECUÁRIA E AGROINDÚSTRIA (SBI-Agro), 2003; 4; p:89-92; Porto Seguro-BA; BRASIL;
- RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F.; SPINACI, M.; GALEATI, G. Effect of nutrition on plasma Progesterone levels, metabolic parameters and small follicles development in unstimulated goats reared under constant photoperiod regimen. *Reproduction of Domestic Animals*. Vol. 40: 548-552, 2005;
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. Vol. 44, 885-900, 1995;
- ROY, A. Egg-yolk coagulatin enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature (London)* v. 179, p. 318, 1957;
- SANTOS, F. C. B.; SOUZA, B. B., ALFARO, C. E. P.; CÉZAR, M. F.; ACOSTA, A. A. A.; SANTOS, J. R. S. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do Nordeste Brasileiro. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 142 -149, Jan/Fev. 2005;

- SANTOS, A. D. F. Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 61p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001;
- SANTIAGO-MORENO, J.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GONZÁLEZ-BULNET, A.; CHEMINEAU, P. Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reproduction Nutrition and Development*. Vol. 40: 421-430, 2000;
- SCOTT, T. W. Lipid metabolism of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 18, p. 65-76, 1973;
- SIMPLÍCIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O.; AZEVEDO, H. C. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos de corte em regiões tropicais. Sobral: *Embrapa Caprinos*, 2001. 47p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 35);
- SIMPLÍCIO, A. A. Manejo reprodutivo e instalações. M. 5, pt. 2. In: CURSO de caprinocultura. Brasília: ABEAS, 1992, 53 p;
- SIMPLÍCIO, A.A. Inseminação artificial na espécie caprina. *Inf. Agropec.*, Belo Horizonte, v. 13, p. 148, 1987;
- SIMPLÍCIO, A. A. et al. Reproductive and productive performance of the undefined (SRD) genotype of goats under the traditional management system of Northeast Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3, 1982, Arizona. Proceedings... p. 349;
- SINGER SJ, NICHOLSON GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175 (23): 720-31.
- SIQUEIRA, A. P. Inseminação Artificial em Caprinos: I - Sincronização do Estro e Eventos Associados, II - Fertilidade do Sêmen Resfriado a 5 °C, por 12 ou 24 Horas. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006;

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA (SBPC).
Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica – Medicina Laboratorial. Coleta de Sangue Venoso. *In site:* http://www.sbpc.org.br/files/pdf/Coleta_sangue_venoso.pdf, visitado a 05/04/2006;
- THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P.; HERNANDEZ, X.; MIGAUD, M.; MALPAUX, B. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domestic Animal Endocrinology*, v.23, p.87-100, 2002;
- THACKER, D. L.; FLIPSE, R. J.; ALMIQUIST, J O. Diluters for bovine semen II. Effect of milk proteins upon spermatozoa liviability. *J. Dairy Sci.*, v. 37, p. 220, 1954;
- UFV. SAEG versão 9.0. Universidade Federal de Viçosa, 2005;
- UPRETI, G. C.; HALL, E. L.; KOPPENS, K.; OLIVER, J. E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. *Animal Reproduction Science*. Vol. 56: 107-121, 1999;
- VASQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P.; Garcia-Artiga, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*. Vol. 47, 913-922, 1997;
- VIANA, A. K. S.; CHALHOUB, M.; FILHO, A, L. R.; ALMEIDA, A. K.; PORTELA, A. P. M.; BITTENCOURT, R. F.; ALVES, S. G. G.; BITTENCOURT, T. C. C.; QUINTELA, A. T. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia. Vol. 7 (1): 67-76, 2006;
- WALKDEN-BROWN, S. W.; NORTON, B. W.; RESTALL, B. J. Seasonal variation in voluntary feed intake and growth in cashmere bucks fed *ad libitum* diets of low or high quality. *Australian Journal of Agriculture research*. Vol. 45: 355-366, 1994;

WATSON, P. F.; KUNZE, E.; CRAMER, P.; HAMMERSTEDT, R. H.
Comparison of critical osmolarity and hydraulic conductivity and its
activation energy in fowl and bull spermatozoa. *Journal of Andrology*. Vol.
13, 131-138, 1992;

ZARAZAGA, L. A.; GUZMÁN, J. L.; DOMÍNGUEZ, C.; PÉREZ, M. C.; PRIETO,
R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish
Payoya goats. *Animal Reproduction Science*. Vol. 87: 253-267, 2005.

7. ANEXOS

Anexo 1. Média de patologias maiores (segundo CBRA, 1998) encontradas no sêmen fresco dos reprodutores, durante todo o período experimental.

Bodes	Raça	Maiores				Total
		Acrossoma	Estreito na base	Fortemente Dobrada	GCP	
1	Saanen	0,0	0,1	0,5	0,1	0,7
2	Alpino	0,5	0,0	0,6	1,0	2,1
3	Saanen	0,2	0,0	0,2	0,1	0,5
4	Alpino	0,3	0,0	0,7	0,1	1,1

Anexo 2. Média de patologias menores (segundo CBRA, 1998) encontradas no sêmen fresco dos reprodutores, durante todo o período experimental.

Bode	Menores				Total
	Cabeça isolada	GCD	Dobrada	Cabeça Delgada	
1	1,4	0,0	8,3	0,0	9,7
2	1,4	1,7	4,5	1,3	8,9
3	1,1	0,1	2,6	1,0	4,8
4	0,1	0,5	1,3	0,0	1,9

¹ GCP – Gota Citoplasmática Proximal

² GCD – Gota Citoplasmática Distal

Anexo 3. Qui-Quadrado, comparando a fertilidade dos acasalamentos de acordo com os meses em que ocorreram.

Meses	Fert.*	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Fert.		45,2	37,5	75,5	66,9	36,5	41,0	43,2	66,7	0,0	43,8	60,3
Jan	45,2											
Fev	37,5	ns										
Mar	75,5	P<0,01	P<0,01									
Abr	66,8	P<0,01	P<0,01	ns								
Mai	36,5	ns	ns	P<0,01	P<0,01							
Jun	41,0	ns	ns	P<0,01	P<0,01	ns						
Jul	43,2	ns	ns	P<0,01	P<0,01	ns	ns					
Ago	66,7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns				
Set	0,0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
Out	43,8	ns	ns	P<0,01	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
Nov	60,3	ns	P<0,05	P<0,01	ns	P<0,01	P<0,01	P<0,01	ns	ns	ns	
Dez	29,3	P<0,05	ns	P<0,01	P<0,01	ns	ns	P<0,05	ns	ns	ns	P<0,01

*Porcentagem acasalados (por monta controlada), que ficaram gestantes.