



## Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial\*

Anselmo Domingos Ferreira Santos<sup>1</sup>, Ciro Alexandre Alves Torres<sup>2</sup>, Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>3</sup>, Alan Maia Borges<sup>4</sup>, José Domingos Guimarães<sup>5</sup>, Eduardo Paulino da Costa<sup>5</sup>, Herbert Rovay<sup>6</sup>

\* Parte do trabalho de dissertação de Mestrado do primeiro autor, financiado pelo CNPq.

<sup>1</sup> Doutor em Zootecnia, DZO/UFV, Viçosa - MG, 36571-000.

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia/UFV, Viçosa - MG, 36571-000.

<sup>3</sup> Embrapa Caprinos, Sobral - CE.

<sup>4</sup> Departamento de Reprodução Animal/UFMG, Belo Horizonte - MG.

<sup>5</sup> Departamento de Medicina Veterinária/UFV, Viçosa - MG.

<sup>6</sup> Mestrando em Zootecnia, DZO/UFV, Viçosa - MG.

**RESUMO** - O congelamento do sêmen de bodes das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial foi avaliado por meio dos testes de termorresistência (TTR), hiposmótico (HOST) e de integridade do acrossoma. Foram utilizados oito machos caprinos (quatro da raça Alpina e quatro da raça Saanen) de duas idades diferentes (jovens e adultos). A qualidade do sêmen durante as etapas do congelamento foi superior em bodes jovens de ambas as raças. Avaliada pelo TTR, a motilidade do sêmen fresco apresentou longevidade pós-descongelamento. Os resultados de motilidade espermática, obtidos imediatamente após o descongelamento, tiveram reflexos positivos sobre o TTR, indicando que os sêmens que apresentaram maior motilidade pós-coleta (86,2% vs 79,3%) e pós-descongelamento (37,7% vs 32,0%) tiveram maior longevidade seminal. Os resultados do HOST, tanto para o sêmen fresco quanto para o congelado, não diferiram entre raças e idades. Houve redução na porcentagem de espermatozoides íntegros após o congelamento e descongelamento do sêmen dos animais da raça Alpina e dos adultos Saanen. Houve redução superior a 14% nos valores do HOST para o sêmen congelado em relação aos valores observados para o sêmen fresco (38,0 vs 52,0%, respectivamente). A motilidade espermática progressiva mostrou maior sensibilidade à criopreservação que a integridade da membrana espermática, indicando que a motilidade espermática é mais afetada pelo processo de congelamento que a membrana plasmática. A integridade do acrossoma não foi influenciada pelo descongelamento. Os índices de danos acrossomais (edema, desprendimento parcial e até perda total de acrossoma) mostraram-se dentro do padrão aceitável (44,5%), tanto no pós-descongelamento como após o término do TTR.

Palavras-chave: caprino, congelamento, hiposmótico, integridade do acrossoma, sêmen, termorresistência

## Use of complementary tests to evaluate the freezing ability of semen from goats under artificial photoperiod exposure

**ABSTRACT**- The freezing ability of semen from Alpine and Saanen goats submitted to an artificial photoperiod exposure were evaluated by the thermo-resistance (TTR) and hypoosmotic (HOST) tests and integrity of the acrosome using eight male goats, four of each breed and two age groups (young and adults). The quality of semen during the freezing process was superior for the young animals of both breeds. Spermatic motility immediately after thawing showed a positive effect on TTR; animals with higher motility after collection (86.2% vs 79.3%) and after thawing (37.7% vs. 32.0%) had a higher seminal longevity. Both fresh and frozen semen did not differ between breeds and ages by the HOST test. There was a 14% decrease ( $P < 0.05$ ) in HOST values for frozen semen compared the fresh semen (38.0 vs. 52.0%, respectively). The spermatic progressive mobility was more sensible to cryopreservation than the integrity of the spermatic membrane, indicating that spermatic mobility is more affected by the frozen process than the plasmatic membrane. The level of acrosome damage (edema, partial and total detachment) was acceptable (44.5%) after thawing and after finishing the TTR.

Key Words: acrosome integrity, freezing, goats, hypoosmotic test, semen, thermo-resistance

### Introdução

O ejaculado caprino apresenta particularidades que o diferenciam do sêmen de outros ruminantes domésticos

(Simplicio & Machado, 1989). Por isso, inúmeras pesquisas têm sido realizadas na área de criopreservação objetivando estabelecer protocolos de congelamento que permitam a obtenção de sêmen com alta viabilidade pós-descongelamento.

mento e, assim, atingir taxas de fertilidade mais elevadas em rebanhos caprinos.

A pesquisa científica tem contribuído para o desenvolvimento da inseminação artificial (IA) na espécie caprina, gerando tecnologias próprias e aplicáveis às condições brasileiras e quantificando as diferenças raciais, estacionais e individuais relacionadas ao comportamento sexual, aos aspectos qualitativos e quantitativos do ejaculado e ao seu congelamento, favorecendo a seleção de bodes doadores com maior potencial para produção de doses de sêmen congelado (Machado & Simplício, 1991).

A estação do ano interfere na atividade espermatogênica de bodes (Delgadillo et al., 1999). As variações na atividade espermatogênica são influenciadas principalmente pelas mudanças fotoperiódicas, de modo que o aumento na duração de luz do dia reduz a atividade espermatogênica (Delgadillo et al., 1991), com diminuição qualiquantitativa na produção e fertilidade do sêmen, resultando em uma porcentagem mínima de motilidade e vigor dos espermatozoides durante a primavera e o verão (estação de anestro das cabras).

Delgadillo & Chemineau (1992b) demonstraram que alterações fotoperiódicas entre dois meses de dias longos (16 horas de luz : 8 horas de escuro) e dois meses de dias curtos (8 horas de luz : 16 horas de escuro) no período de anestro reprodutivo eliminaram a variação sazonal na qualidade do sêmen, com aumento de 54,7% de doses congeladas em relação ao grupo controle, no qual a fertilidade seminal não se alterou.

Quanto ao processo de preservação de sêmen, especialmente o congelado, a ocorrência de danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides reduz a motilidade e a viabilidade, impedindo o trânsito espermático no trato reprodutivo feminino e, conseqüentemente, prejudicando a fertilidade (Leboeuf et al., 2000). Estes danos são atribuídos à ruptura da membrana espermática, causada pela formação de cristais de gelo intracelular, que ocorre durante o processo de congelamento e descongelamento (Mazur, 1984).

Testes de laboratório podem ser utilizados para analisar a qualidade do sêmen após o descongelamento. O teste de termorresistência (TTR) é utilizado para avaliar o comportamento (motilidade e vigor) dos espermatozoides quando incubados a 37°C por determinado tempo e, desta forma, prever a fertilidade seminal (Barnabe et al., 1981). O teste hiposmótico (HOST) baseia-se na observação de que a membrana espermática íntegra, quando exposta a uma solução hiposmótica, permite por osmose a passagem de água para o interior da membrana celular até que ocorra o

restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (Jeyendran et al., 1984). A integridade do acrossoma é de grande importância para a fertilização (De Leeuw et al., 1991), pois permite a ocorrência da reação acrossômica, ativada por condições locais ou ligações específicas do espermatozoide com a zona pelúcida do ovócito, com posterior liberação de seu conteúdo enzimático (lisossomas).

O objetivo neste estudo foi avaliar o congelamento do sêmen de machos caprinos das raças Alpina e Saanen de duas idades diferentes, após manejo de fotoperíodo artificial, durante o final do inverno e início da primavera.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, situada a 2045°20' latitude S e 42°52'40" W Gr, altitude média de 752,5 m, temperatura média anual de 20,9°C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm<sup>3</sup> e clima do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso), pela classificação de Köeppen (Fonte: CETEC).

O período experimental foi de julho a novembro de 2000, quando os animais se encontravam no período de estação não reprodutiva. Foram selecionados como doadores de sêmen oito reprodutores adultos, clinicamente sadios (quatro machos da raça Alpina e quatro da raça Saanen), jovens e adultos, com 12,4 ± 1,5 e 11,0 ± 0,0, e 65,0 ± 0,0 e 51,1 ± 2,0 meses de idade, respectivamente.

Houve diferença (P<0,05) entre idades dentro de raças, portanto, foi possível fazer um estudo comparativo entre grupos isolados sobre as características reprodutivas dependentes dos fatores raça e idade e de suas interações, sob os mais variados aspectos, relacionadas à fertilidade do macho caprino fora da estação reprodutiva. Neste experimento, a idade média dos animais jovens foi de 11,7 meses e, portanto, foram considerados maduros sexualmente.

Os animais foram manejados em baias individuais e alimentados com dieta constituída de 50% de silagem de milho, 30% de milho desintegrado com palha e sabugo + 5% de uréia, e 20% de polpa cítrica. O valor nutricional da alimentação foi de 1,47% de EL (mcal), 11,68% de PB, 30,88% de FDN, 0,53 % de Ca e 0,24% de P. O consumo total estimado foi de 1,5 kg de MS ou 2,9 kg de matéria natural por animal. O sal mineral e a água foram fornecidos *ad libitum* e o controle sanitário dos animais foi realizado periodicamente, conforme o esquema pré-estabelecido pelo setor.

No período de 1º de julho a 30 de agosto de 2000 (60 dias), os animais foram submetidos a tratamento de

fotoperíodo artificial (Delgadillo & Chemineau, 1992b). Um *timer* foi programado para acender as lâmpadas mistas (220 W) nas baias, de 17 às 20 h e de 4 às 7 h, de forma que os animais permanecessem diariamente 16 horas em ambiente claro e 8 horas no escuro.

A avaliação das características reprodutivas dos machos foi iniciada após o final do tratamento de fotoperíodo artificial, sendo dividida em dois períodos: período 1 - início em 31 de agosto e final em 15 de setembro; e período 2 - início em 16 de setembro e término em 10 de outubro de 2000.

As coletas de sêmen foram realizadas três vezes por semana, em dias alternados, de 7 às 10 h, pelo método da vagina artificial com água aquecida entre 42 e 44°C. Utilizou-se como manequim uma fêmea em estro induzido pela aplicação de 1,0 mg de benzoato de estradiol (Estrogen<sup>®</sup> - Farmavet) no primeiro dia e 0,5 mg sempre que a fêmea se tornou menos receptiva ao macho.

Foram realizadas 12 coletas de sêmen por animal durante o período experimental. Em cada dia de coleta, foram utilizados dois machos de cada raça, em idades similares, alternando-se a ordem de coleta dos animais para evitar o efeito da estimulação visual sobre as características seminais e comportamentais (Price et al., 1985; Signoret et al., 1990). O ejaculado foi coletado em tubos graduados, protegidos da luz solar com papel laminado e acondicionados em isopor.

Após a coleta, o sêmen foi enviado ao laboratório de processamento e colocado em banho-maria, a 37°C, procedendo-se ao exame físico do ejaculado (volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática progressiva). O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo de centrifuga graduado e registrado em mililitros (mL) e o turbilhonamento (escala de 0-5) foi avaliado por meio de observação ao microscópio, em objetiva de 10x, de uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida em mesa aquecedora a 37°C.

O vigor (escala de 0-5) e a motilidade espermática progressiva (0-100%) foram avaliados pela observação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula em objetiva de 40x, como preconizado pelo CBRA (1998). No cálculo da concentração espermática, utilizou-se a câmara de Neubauer com sêmen diluído na proporção de 20 mL para 4,0 mL de solução de formol-salina tamponada (1:200), segundo Hancoch (1957). O número total de espermatozoides no ejaculado foi obtido multiplicando-se o volume de sêmen ejaculado (mL) pela concentração espermática/mL. Após os exames físicos, os ejaculados foram destinados às etapas de processamento de congelamento.

As anormalidades de cabeça, acrossoma, peça intermediária e cauda dos espermatozoides, bem como a presença

de gota citoplasmática proximal ou distal, foram avaliadas por meio de preparação úmida entre lâmina e lamínula, utilizando-se microscópio com contraste de fase acoplado e aumento de 1.000 vezes, contando-se 200 células espermáticas. O resultado foi expresso em porcentagem de defeitos maiores, menores e totais (Blom, 1973).

Para a integridade da membrana plasmática, avaliaram-se todas as partidas de sêmen fresco e congelado, por meio do teste Hiposmótico (HOST) utilizando-se 1,0 mL de uma solução com frutose na osmolaridade de 60 mOsm, acrescida de 0,1 mL de sêmen. Esta osmolaridade foi estabelecida com base nos resultados obtidos por Kumi-Diaka (1993) e Bueno (1999) em sêmen de cães. Essa solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora e, após esse período, colocou-se uma amostra entre lâmina e lamínula pré-aquecida a 37°C, contando-se 200 espermatozoides em microscopia de contraste de fase com aumento de 1.000 vezes. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda fortemente dobrada ou enrolada e somente dobrada ou enrolada (%), que foram uniformizadas para cauda dobrada. O valor final obtido foi subtraído do valor encontrado para o total de espermatozoides com cauda fortemente dobrada ou enrolada e somente dobrada ou enrolada (%) do sêmen fresco.

Após o exame físico do ejaculado, o sêmen foi centrifugado duas vezes, a 200x g (gravidade) durante 10 minutos, utilizando-se a solução de lavagem Ringer-Lactato na proporção de 1 (sêmen) : 9 (Ringer-Lactato), descartando-se o sobrenadante. Em seguida, *opellet* foi ressuspenso com diluente à base de Tris-citrato-gema de ovo sem glicerol (Roberts, 1986), na proporção de 1:1, para avaliação da motilidade progressiva espermática, do vigor espermático, por meio de microscopia em aumento de 200x, e da concentração espermática, por meio da contagem em câmara de Neubauer. Depois de calcular o número de doses (100 milhões de espermatozoides/dose), adicionou-se metade do diluente (sem glicerol) e, após a homogeneização, colocou-se em *freezer* estabilizado a 4°C, durante 2 horas (curva de resfriamento de 1,07°C/min nos primeiros 30 minutos + 1,5 hora a 4°C), conforme Barbosa (1999). Ao final do período de resfriamento, foi acrescentada a outra metade do diluente com 8% de glicerol (Roberts, 1986) resfriado a 4°C, obtendo-se a concentração final de 4% do crioprotetor.

O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e resfriado a 4°C. As palhetas foram colocadas horizontalmente sobre vapor de nitrogênio líquido (5 cm acima da superfície líquida) durante 15 minutos e, em seguida, foram mergulhadas em nitrogênio a -196°C.

As amostras do sêmen foram descongeladas a 37°C por 50 segundos e avaliadas quanto à motilidade e ao vigor

espermático. Todas as partidas, inclusive as que não apresentaram o mínimo de 30% de motilidade e 3% de vigor pós-descongelamento (CBRA, 1998) foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR), realizado segundo preconizado pelo CBRA (1998): as partidas de sêmen foram descongeladas a 37°C e acondicionadas em tubos *eppendorf*, sendo cobertas com uma gota de óleo mineral pré-aquecido e incubadas a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático por meio de microscopia com contraste de fase acoplado, em aumento de 200 e 400x, nos tempos zero (após cinco minutos) e a cada hora após o descongelamento.

A avaliação de danos acrossomais (edema e desprendimento parcial e total de acrossoma) foi realizada no início e ao final do TTR. Para isso, uma amostra do sêmen descongelado (100 mL) foi acondicionada em tubo *eppendorf* com solução de formol salina tamponado (Hancock, 1957). Posteriormente, por ocasião do exame, confeccionou-se a preparação úmida da amostra de sêmen entre lâmina e lamínula, procedendo-se à avaliação acrossomal por meio de microscopia com contraste de fase em aumento de 1.000 vezes e imersão (Soderquist et al., 1997). O percentual de anormalidade de acrossoma foi feito sobre a contagem de 200 células espermáticas, computando-se os acrossomas intactos e anormais.

Para as características do teste de termoresistência e integridade do acrossoma, em que o período não tem efeito, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2x2 (duas raças e duas idades). As análises foram processadas pelo Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas 8.0 (UFV, 1997), segundo o modelo:

$$y_{ijk} = \mu + R_i + I_j + RI_{ij} + e_{ijk}$$

em que  $y_{ijk}$  = observação no animal  $k$  na idade  $j$  da raça  $i$ ;  $\mu$  = média geral;  $R_i$  = efeito da raça  $i$ ,  $i = 1,2$ ;  $I_j$  = efeito da idade  $j$ ,  $j = 1,2$ ;  $RI_{ij}$  = efeito da interação raça x idade;  $e_{ijk}$  = erro associado a cada observação  $ijk$ .

As médias das características foram testadas pelos teste Fisher (teste F; duas comparações) e Student-Newman-Keuls (teste SNK; comparações múltiplas) e processadas pelo SAS 6.12 (1998) e pelo SAEG 8.0 (1997) a 5% de probabilidade. Foram realizadas correlações de Pearson entre os testes *in vitro* aplicados às amostras de sêmen, processados pelo SAEG 8.0.

## Resultados e Discussão

Os aspectos quantitativos e qualitativos do sêmen avaliados após a coleta estão sumarizados na Tabela 1.

Após a avaliação física e morfológica do ejaculado, os animais jovens, de ambas as raças, apresentaram sêmen com volume, concentração espermática total e defeitos maiores e totais inferiores ( $P < 0,05$ ) aos dos machos adultos. Os animais jovens foram superiores aos adultos apenas quanto ao turbilhonamento ( $P < 0,05$ ). O sêmen de animais adultos da raça Saanen apresentou motilidade progressiva e vigor inferiores ( $P < 0,05$ ) ao de todos os outros grupos.

Koutsouris & Elefeteriou (1990) citaram que animais da raça Saanen são mais sensíveis às mudanças da estação do ano e do fotoperíodo que os de outras raças, o que pode ser reflexo do maior bloqueio no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, levando, conseqüentemente, à menor produção de andrógenos e acarretando redução na

Tabela 1 - Características seminais de reprodutores das raças Alpina e Saanen após manejo artificial do fotoperíodo durante o final do inverno e início da primavera

Table 1 - Characteristics of semen from goats of Alpine and Saanen breeds under artificial photoperiodic exposure

	Alpina <i>Alpine</i>		Saanen <i>Saanen</i>	
	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>
Volume (mL)	0,6±0,3 <sup>A,a</sup>	0,8±0,3 <sup>A,b</sup>	0,4±0,2 <sup>B,b</sup>	1,1±0,4 <sup>A,a</sup>
Turbilhonamento (0 - 5) ( <i>Mass movement</i> )	4,5±0,7 <sup>A,a</sup>	3,9±0,6 <sup>B,a</sup>	4,5±0,5 <sup>A,a</sup>	2,6±1,3 <sup>B,b</sup>
Motilidade (%) ( <i>Motility</i> )	87,5±7,5 <sup>A,a</sup>	84,8±7,5 <sup>A,a</sup>	85,0±7,7 <sup>A,a</sup>	73,6±11,9 <sup>B,b</sup>
Vigor (0 - 5)	4,9±0,3 <sup>A,a</sup>	4,9±0,3 <sup>A,a</sup>	4,8±0,4 <sup>A,a</sup>	4,5±0,7 <sup>B,b</sup>
Concentração total (x10 <sup>9</sup> ) ( <i>Total concentration</i> )	1,7±1,2 <sup>B,a</sup>	2,4±1,5 <sup>A,a</sup>	1,3±0,9 <sup>B,a</sup>	3,0±1,7 <sup>A,a</sup>
Defeitos maiores (%) ( <i>Major defects</i> )	4,9±2,6 <sup>B,a</sup>	7,2±4,2 <sup>A,a</sup>	6,5±5,0 <sup>B,b</sup>	17,4±17,5 <sup>A,b</sup>
Defeitos menores (%) ( <i>Minor defects</i> )	9,7±9,6 <sup>A,a</sup>	12,1±8,7 <sup>A,a</sup>	4,9±4,4 <sup>A,a</sup>	10,2±10,6 <sup>A,a</sup>
Defeitos totais ( <i>Total defects</i> )	14,1±10,8 <sup>B,a</sup>	19,3±9,9 <sup>A,a</sup>	11,5±7,5 <sup>B,a</sup>	27,8±26,5 <sup>A,a</sup>

<sup>A,B, a,b</sup> Médias seguidas pela mesmas letras na mesma linha não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste SNK. Letras minúsculas comparam idade entre raças e letras maiúsculas comparam idade dentro de raça.

<sup>A,B a,b</sup> Means followed by the same letters in the same row did not differ ( $P < 0,05$ ) by SNK test. Small letters compare age between breeds and capital letters compare age within breeds.

estimulação das glândulas sexuais acessórias e na produção de plasma seminal e, dessa forma, menor volume do ejaculado (Delgadillo & Chemineau, 1992a).

A motilidade espermática progressiva e o vigor espermático nas diferentes etapas de processamento do sêmen nas diferentes raças e idades estão sumarizados na Tabela 2 e as correlações de Pearson entre a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático durante o processo de congelamento e descongelamento do sêmen (TTR) estão apresentadas na Tabela 3. Desde que o sêmen descongelado após a inseminação sofra similares tipos de incubação no trato genital feminino, a sobrevivência dos espermatozoides incubados *in vitro* por longa duração pode prever a habilidade fertilizante do sêmen.

Conforme Kumar (2000), a motilidade progressiva é essencial para a fertilidade, pois facilita a passagem pelo trato genital feminino e torna possível a penetração nas células do *cumulus* e na zona pelúcida do ovócito. Como demonstrado na Tabela 2, tanto o vigor quanto a motilidade espermática progressiva, durante o teste de termoresistência (TTR), apresentaram comportamento semelhante, sendo altos nas primeiras horas do teste, diminuindo nas horas intermediárias e, posteriormente, estabilizando em baixos valores nas horas finais do teste. McLaughlin et al. (1992) verificaram que o processo de criopreservação diminui a

motilidade média dos espermatozoides em aproximadamente 40% sobre os valores iniciais, com maior redução no sêmen de qualidade inferior.

A qualidade do sêmen diluído, resfriado e congelado foi influenciada pela idade ( $P < 0,05$ ). A motilidade espermática progressiva do sêmen diluído e resfriado foi maior nos animais jovens que nos adultos, porém, não houve efeito de raça. O vigor espermático comportou-se de modo idêntico. Os animais jovens apresentaram melhor vigor ( $P < 0,05$ ) que os adultos, mas não houve efeito de raça, provavelmente pelo fato de os animais jovens apresentarem melhor motilidade desde o momento da coleta (Tabela 1) e, também, por causa da correlação da motilidade espermática progressiva pós-coleta com a motilidade durante o processo de congelamento e descongelamento (Tabela 4) (Barnabe et al., 1981).

De modo geral, durante todo o processo de congelamento e descongelamento, o padrão de resposta foi similar, com motilidade e vigor maiores nos animais jovens que nos adultos, sem efeito de raça. A menor motilidade pós-descongelamento para os animais adultos pode ser atribuída ao volume seminal, que teve correlação negativa ( $r = -0,27$ ;  $P < 0,05$ ) com o congelamento do sêmen (motilidade avaliada no TTR após o descongelamento).

O sêmen de animais jovens da raça Alpina apresentou melhor congelamento, atribuído à maior motilidade e ao vigor

Tabela 2 - Motilidade espermática progressiva e vigor espermático durante os processos de congelamento e descongelamento (TTR) do sêmen de animais das raças Alpina e Saanen

Table 2 - Spermatic progressive motility and vigor during the freezing and thawing process (TTR) of semen from goats of Alpine and Saanen breeds

	Alpina <i>Alpine</i>		Saanen <i>Saanen</i>	
	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>
Mot. sêmen diluído (%) ( <i>Motility</i> )	83,0±11,1 <sup>A</sup>	77,2±17,0 <sup>B</sup>	83,5±7,0 <sup>A</sup>	69,6±17,4 <sup>B</sup>
Vigor (0 - 5)	4,75±0,44 <sup>A</sup>	4,4±0,6 <sup>B</sup>	4,6±0,5 <sup>A</sup>	4,2±0,7 <sup>B</sup>
Mot. sêmen resfriado (%) ( <i>Cooled semen motility</i> )	76,8±14,8 <sup>A</sup>	69,7±16,6 <sup>B</sup>	79,2±9,7 <sup>A</sup>	56,1±18,3 <sup>B</sup>
Vigor (0-5)	4,5±0,6 <sup>A</sup>	4,1±0,7 <sup>B</sup>	4,4±0,7 <sup>A</sup>	3,7±0,8 <sup>B</sup>
0:00 h (0:00 a.m.)				
Motilidade (%) ( <i>Motility</i> )	43,4±11,9 <sup>A</sup>	31,9±14,0 <sup>A</sup>	37,1±15,4 <sup>B</sup>	26,9±10,7 <sup>B</sup>
Vigor (0 - 5)	3,8±0,4 <sup>A</sup>	2,8±0,7 <sup>A</sup>	3,2±0,8 <sup>B</sup>	2,8±0,4 <sup>B</sup>
0:05 h (0:05 a.m.)				
Motilidade (%) ( <i>Motility</i> )	39,4±11,2 <sup>A</sup>	30,9±13,9 <sup>A</sup>	35,9±15,6 <sup>B</sup>	24,2±10,1 <sup>B</sup>
Vigor (0 - 5)	3,3±0,5 <sup>A</sup>	2,6±0,5 <sup>A</sup>	3,0±0,8 <sup>B</sup>	2,6±0,5 <sup>B</sup>
1:00 h (1:00 a.m.)				
Motilidade (%) ( <i>Motility</i> )	36,9±10,0 <sup>A,a</sup>	30,0±12,4 <sup>B,a</sup>	30,6±14,9 <sup>A,b</sup>	20,7±10,7 <sup>B,b</sup>
Vigor (0 - 5)	2,9±0,7	2,6±0,5	2,6±0,9	2,4±0,5
2:00 h (2:00 a.m.)				
Motilidade (%) ( <i>Motility</i> )	32,2±11,4 <sup>A,a</sup>	25,0±10,5 <sup>B,a</sup>	24,8±15,5 <sup>A,b</sup>	18,9±10,5 <sup>B,b</sup>
Vigor (0 - 5)	2,7±0,7 <sup>A,a</sup>	2,3±0,6 <sup>A,a</sup>	2,1±0,9 <sup>B,b</sup>	2,1±0,8 <sup>B,b</sup>

<sup>A,B</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, dentro de cada raça, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>a,b</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, dentro da mesma idade entre raça, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>A,B</sup> Means followed by the same letters in the same row within each group of breed did not differ by F test at 5% of probability.

<sup>a,b</sup> Means followed by the same letters in the same row within age and between breed did not differ by F test at 5% of probability.

Tabela 3 - Correlações de Pearson entre a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático durante os processos de congelamento e descongelamento do sêmen (TTR)

Table 3 - Pearson correlation estimates between spermatic progressive motility and vigor during freezing and thawing (TTR) of semen

Parâmetro Aspect	r*	P <
Mot <sub>C</sub> vs Mot. Sêmen diluído ( <i>diluted semen</i> )	0,64	0,0005
Mot <sub>C</sub> vs Mot. Sêmen resfriado ( <i>cooled semen</i> )	0,55	0,0004
Mot <sub>C</sub> vs TTR Motilidade 0:00 h ( <i>motility 0:00 a.m.</i> )	0,30	0,0035
Mot <sub>C</sub> vs TTR Motilidade 0:05 h ( <i>motility 0:05 a.m.</i> )	0,36	0,0024
Mot <sub>C</sub> vs TTR Motilidade 1:00 h ( <i>motility 1:00 a.m.</i> )	0,38	0,0041
Mot <sub>C</sub> vs TTR Motilidade 2:00 h ( <i>motility 2:00 a.m.</i> )	0,45	0,0087
Mot <sub>0h</sub> TTR vs TTR Motilidade 0:05 h ( <i>motility 0:05 a.m.</i> )	0,94	0,0000
Mot <sub>0h</sub> TTR vs TTR Motilidade 1:00 h ( <i>motility 1:00 a.m.</i> )	0,89	0,0000
Mot <sub>0h</sub> TTR vs TTR Motilidade 2:00 h ( <i>motility 2:00 a.m.</i> )	0,77	0,0000

Significativo ( $P < 0,05$ ); Mot<sub>C</sub> – motilidade do sêmen avaliado após coleta; Mot<sub>0h</sub> TTR – motilidade do sêmen avaliado logo após o descongelamento no TTR  
 Significant ( $P < 0,05$ ); Mot. – semen motility after collection; Mot<sub>0h</sub> TTR – semen motility evaluated by TTR after thawing.

espermático durante todo o período experimental. Ressalta-se que todos os animais produziram ejaculados aptos a serem utilizados em programas de inseminação artificial. De forma semelhante ao encontrado neste estudo, Ferrari et al. (1998) encontraram 38,2% para a motilidade do sêmen congelado e descongelado em diluente à base de Tris.

Houve correlações médias entre a motilidade do sêmen avaliado após a coleta com a motilidade avaliada durante os processos de congelamento e descongelamento, quando avaliadas no TTR, corroborando os resultados obtidos por Corteel (1981), citado por Maia & Vieira (1992). A correlação foi maior no sêmen diluído e diminuiu durante o resfriamento, o que era esperado, pois o resfriamento e o congelamento são utilizados com o objetivo de reduzir o metabolismo e a motilidade do sêmen. Após o descongelamento, observou-se queda da correlação entre a motilidade à coleta e a motilidade no TTR no tempo zero. Com o passar do tempo, esta correlação teve aumento pequeno e progressivo, indicando que os ejaculados que mantiveram maior motilidade no final do TTR foram aqueles que tiveram alta motilidade espermática imediatamente após a coleta. Por outro lado, a alta correlação entre a motilidade do sêmen logo após o descongelamento (0 h) com as horas seguintes teve reflexos positivos sobre o TTR, comprovando que esta primeira observação (0 h) é suficiente para predizer a longevidade seminal.

Os valores médios para o HOST do sêmen fresco e congelado de bodes jovens e adultos das raças Alpina e Saanen encontram-se na Tabela 4.

Os resultados do HOST, tanto para o sêmen fresco quanto para o congelado, não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre raças e idades. Houve redução ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides íntegros após o congelamento e descongelamento do sêmen dos animais da raça Alpina, bem como dos adultos Saanen. A similaridade dos resultados entre a

porcentagem de caudas enroladas dos sêmens fresco e congelado de animais jovens da raça Saanen pode ser atribuída à variação individual (coeficiente de variação = 40,7) entre esses sêmens. Mesmo assim, verificou-se redução na porcentagem de caudas enroladas no sêmen congelado, podendo-se afirmar que o congelamento e o descongelamento afetaram negativamente a porcentagem de caudas dobradas.

A criopreservação é um processo estressante à célula espermática e provocou redução superior a 14% na integridade da membrana de espermatozóide avaliada pelo HOST para o sêmen congelado em relação aos valores observados para o teste em sêmen fresco. Comparando estes resultados aos de outras espécies, Kumi-Diaka (1993), utilizando uma solução de 60 mOsm encontrou 82,6% de caudas dobradas em sêmen fresco de cães e, após o descongelamento, obteve valor de 56,7%, que representa redução de 25,9% entre o sêmen fresco e o congelado. Também, Neild et al. (1999), incubando sêmen fresco de equinos em solução de 50 mOsm, obtiveram valores de 46,0% de caudas dobradas e, após congelamento e descongelamento, esta porcentagem diminuiu para 30,2% de caudas dobradas, uma diferença de 15,8% entre o sêmen fresco e o congelado. A pequena redução encontrada neste estudo pode ser resultado do excelente congelamento seminal, normalmente obtido na espécie caprina, independentemente da influência da temperatura sobre a qualidade da membrana.

Na Tabela 4, verificam-se maiores porcentagens de caudas dobradas em relação às fortemente dobradas, comprovando que nem todos os espermatozoides respondem com a mesma intensidade ao HOST, com demonstrado por Bueno (1999), que afirmou que os filamentos do axonema da cauda podem sofrer flexões em graus diferentes, conforme a quantidade de água que entra na célula, pois foram verificados diferentes tipos de

Tabela 4 - Valores médios para HOST de sêmen fresco e congelado de bodes jovens e adultos das raças Alpina e Saanen

Table 4 - Host average values for thawed and frozen semen from goats of Alpine and Saanen breeds

	Alpina <i>Alpine</i>		Saanen <i>Saanen</i>	
	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>
Sêmen fresco ( <i>Thawed semen</i> )				
Cauda dobrada ou enrolada (%) ( <i>Curled tail</i> )	39,9±13,7	43,1±12,3	40,42±14,5	40,1±11,8
Cauda fort. dobrada ou enrolada (%) ( <i>Tightly curled tail</i> )	7,5±6,5	14,05±12,4	11,4±11,2	12,13±11,2
Total (%)	47,8±16,4 <sup>A</sup>	57,2±15,6 <sup>A</sup>	51,6±22,5 <sup>A</sup>	51,3±5,0 <sup>A</sup>
Sêmen congelado ( <i>Frozen semen</i> )				
Cauda dobrada ou enrolada (%) ( <i>Curled tail</i> )	26,4±6,8	31,7±11,1	33,6±11,4	26,8±10,7
Cauda fort. dobrada ou enrolada (%) ( <i>Tightly curled tail</i> )	9,9±5,6	7,9±6,0	8,1±5,1	6,2±3,9
Total (%)	36,3±10,6 <sup>B</sup>	39,8±15,0 <sup>B</sup>	41,7±14,5 <sup>A</sup>	33,0±14,3 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, dentro de cada grupo de idade, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste F.<sup>A,B</sup> Means followed by the same letters in the same column within each group of age did not differ by F test at 5% of probability.

Tabela 5 - Valores médios para anomalias do acrossoma após o descongelamento e ao final do TTR em sêmen descongelado de reprodutores das raças Alpina e Saanen

Table 5 - Average values for acrossomal anomalies after thawing and after the end of TTR on semen from goats of Alpine and Saanen breeds

	Alpina <i>Alpine</i>		Saanen <i>Saanen</i>	
	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>	Jovens <i>Young</i>	Adultos <i>Adult</i>
0:00 h (0:00 a.m.)				
Normal	53,0±11,7	57,0±10,1	55,0±9,3	55,8±6,5
Anormal ( <i>Abnormal</i> )	46,1±11,9	43,0±10,1	45,03±9,2	44,2±6,5
2:00 h (2:00 a.m.)				
Normal	46,3±9,0	45,2±7,8	47,5±11,7	44,5±7,9
Anormal ( <i>Abnormal</i> )	53,7±8,9	54,8±7,8	52,5±11,7	55,5±7,9

enrolamento de cauda, desde pequena curvatura na ponta da cauda até cauda fortemente dobrada e dobramentos intermediários.

Verificaram-se diminuições de 10,7 e 17,9% de caudas dobradas entre o congelamento e o descongelamento do sêmen avaliado por meio do HOST para reprodutores jovens e adultos, respectivamente. A qualidade seminal foi sempre superior nos animais jovens, o que pode ser explicado pelo fato de os animais adultos estarem em repouso sexual prolongado antes do início do experimento, implicando queda da qualidade seminal, enquanto os animais jovens, dado o comportamento de masturbação, tinham suas reservas seminais constantemente renovadas.

No sêmen fresco, não houve correlação entre a motilidade espermática progressiva e os valores do HOST. Porém, Kumi-Diaka (1993) obteve correlação de  $r = 0,94$  entre a motilidade do sêmen fresco com os valores do HOST. Neild et al. (1999) encontraram correlação de  $r = 0,75$  entre a motilidade do sêmen fresco e o HOST. Para o sêmen congelado, foi encontrada correlação de  $r = 0,53$

(motilidade avaliada no TTR a 0 h) comparável à de  $r = 0,57$  encontrada por Neild et al. (1999).

Adicionalmente, a motilidade espermática progressiva mostrou maior sensibilidade à criopreservação que à integridade da membrana, indicando que a motilidade dos espermatozoides é mais afetada pelo processo de congelamento que a membrana plasmática.

Os valores médios para o percentual de acrossomas intactos e anormais achados após o descongelamento e TTR encontram-se sumarizados na Tabela 5. Não se verificou diferença quanto aos danos acrossomais entre os grupos estudados ( $P > 0,05$ ).

A integridade do acrossoma apresenta alta correlação ( $r = 0,81$ ) com a fertilidade (Saacke & White, 1972 citados por Kumar, 2000). Os acrossomas são necessários para proteger e liberam o conteúdo enzimático no tempo e local determinados para a fertilização.

Neste estudo, a integridade do acrossoma não foi influenciada pelo descongelamento nem pelo teste de termorresistência. Logo após o descongelamento do sêmen,

as lesões de acrossoma foram altas (43 a 46%). Entretanto, esses índices de danos acrossomais (edema, desprendimento parcial e até perda total de acrossoma) são aceitáveis, tanto no pós-descongelamento como após o término do TTR. Em média, os valores encontrados foram de 50% de lesões acrossomais de 0 e 2 horas após o descongelamento, enquanto Tasseron et al. (1977), Memon et al. (1985), Soderquist et al. (1997) obtiveram valores que de 35 a 40%.

## Conclusões

A qualidade e o congelamento do sêmen de animais da raça Alpina após tratamento de luz artificial fora da estação reprodutiva foram melhores que do sêmen de animais Saanen. O teste de termorresistência mostrou-se útil para prever a longevidade do sêmen pós-descongelamento e, portanto, seu uso deve se tornar rotina em laboratórios de manipulação de sêmen caprino. A motilidade espermática foi mais sensível aos efeitos deletérios durante o congelamento e descongelamento que a integridade da membrana espermática.

## Agradecimento

Ao CNPq, pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado; ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, pelo espaço e suporte técnico para este estudo; à equipe do Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia, em especial ao Prof. Ciro Alexandre Alves Torres e Jeferson Ferreira da Fonseca, pela experiência, amizade e compreensão; ao Setor de Caprinocultura; e aos demais professores, colegas e funcionários do DZO e DVT.

## Literatura Citada

- BARBOSA, L.P. **Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 71p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISITIN, J.A. Estudo comparativo entre as provas rápidas e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, n.3-4, p.7-11, 1981.
- BLOM, E. The ultra structure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.25, p.383-391, 1973.
- BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; WOELDERS, H. The fix vital stain method. **Journal of Andrology**, v.12, p.112-118, 1991.
- DELGADILLO, J.A.; CHEMINEAU, P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.45-55, 1992a.
- DELGADILLO, J.A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. **Theriogenology**, v.36, p.755-770, 1991.
- DELGADILLO, J.A.; CHEMINEAU, P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.45-55, 1992b.
- DELGADILLO, J.A.; CANEDO, G.A.; CHEMINEAU, P. et al. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. **Theriogenology**, v.52, p.727-737, 1999.
- FERRARI, S.; LEINZ, F.; BARNABE, V.H. Inseminação artificial em cabras com sêmen congelado: resultados preliminares. **Brazilian Journal Research Animal Science**, v.35, p.5. 1998. (Abst.)
- HANCOCH, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Reproduction Microscopy Science**, v.76, p.84-97, 1957.
- JEYENDRAN, R.S.; Van der Ven H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. 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**, v.70, p.219-228, 1984.
- KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of *in vitro* fertilizing capacity of spermatozoa. **Indian Veterinary Medicine Journal**, v.24, p.1-6, 2000.
- KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAN, J.S. Seasonal and age - related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **Veterinary Record**, v.108, p.13-15, 1981.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.2, p.113-141, 2000.
- MACHADO, R.; SIMPLICIO, A.A. Efeito do tipo racial e da época do ano sobre o ejaculado de caprinos criados em região semi-árida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1991. p.433.
- MAIA, M.; VIEIRA, R.J. Comportamento sexual do caprino. II. Aspectos quanti-qualitativos do sêmen no período pós-uberal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.16, n.1-2, p.23-32, 1992.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.
- McLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.527-534, 1992.
- MEMON, A.M.; BRETZLAFF, K.N.; OTT, R.S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.2, p.473-475, 1985.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.
- PRICE, E.O.; SMITH, V.M.; KATZ, L.S. Sexual stimulation of male dairy goats. **Applied Animal Behavior Science**, v.13, p.83-92, 1985.
- ROBERTS, S.J. **Veterinary obstetrics and genital diseases** (Theriogenology). 3.ed. Michigan: Edwards Brothers, 1986. 981p.



- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **SAEG - Sistema de Análise Estatísticas e Genéticas**. versão 8.0. Viçosa, MG: 1997 (Manual do usuário). 221p.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS user's guide statistics**. version 6. 12.ed. Cary: 1998. 956p.
- SIGNORET, J.P.; COHEN-TANNOUDI, J.; GONZALES, R. Hormones and behavior in vertebrates. 2. Behavioral in males and females - Social interactions and reproductive endocrinology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HORMONES, BRAIN AND BEHAVIOUR, 1990, Liège. **Proceedings...** Liège: Base Karger, 1990. v.9, p.188-200.
- SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989. p.171-177.
- SODERQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v.48, p.1115-1125, 1997.
- TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.461-462, 1977.

---

Recebido: 20/01/05  
Aprovado: 08/06/06