



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALEX SOUZA RIQUE

**EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E AÇÚCARES NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS**

**JOÃO PESSOA
2017**

ALEX SOUZA RIQUE

**EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E AÇÚCARES NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso,
do Bacharelado em Biotecnologia da
Universidade Federal da Paraíba, para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Sildivane Valcácia Silva

Co-Orientadora:

Aline Francelina de Queiros

**JOÃO PESSOA
2017**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48e Rique, Alex Souza.

Efeito da centrifugação e açúcares na criopreservação de espermatozoides caprinos / Alex Souza Rique. - João Pessoa, 2017.

56 f. : il.

Orientação: Sildivane Valcácia Silva.

Coorientação: Aline Francelina de Queiros.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Criopreservação - Sêmen caprino. 2. Plasma seminal.
3. Diluidores de sêmen. I. Silva, Sildivane Valcácia.
II. Queiros, Aline Francelina de. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



João Pessoa, 20 de novembro de 2017.

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte dias do mês de novembro de 2017, às 16:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Sildivane Valcácia Silva e composta pelos avaliadores 1. Prof. Ms. Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva (PPGCAT/UFRPE); 2. Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente (DCA/UFPB), o discente Alex Souza Rique, matrícula 11312240, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Efeito da centrifugação e açúcares na criopreservação de espermatozoides caprinos**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Sildivane Valcácia Silva, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.



Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

Dedico este trabalho à minha mãe, Jeane, e ao meu tio, Edigardo, por me ensinarem os valores corretos da vida, sempre apontando as diferenças entre o certo e o errado. Obrigado por sempre me apoiarem e incentivarem, mesmo diante das dificuldades encontradas no caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Jeane, por todo o amor, carinho, dedicação, companheirismo e paciência. Por ser meu porto seguro e fazer o possível e impossível para me apoiar em todas as minhas escolhas. Por me escutar em longas conversas no fim do dia, mesmo quando tudo se resumia a reclamações e desabafos. Te amo!

Ao meu tio, Edigardo, por ser o maior motivador da minha curiosidade científica, pelas várias horas de conversas bobas e inspiradoras, pela paciência com uma pessoa que nem sempre é fácil de lidar e por me apoiar mesmo perante as dificuldades.

A toda minha família que me apoiou e incentivou, dando suporte e palavras de carinho nas horas mais difíceis.

À melhor orientadora que alguém pode ter, Prof^a. Dr^a. Sildivane Valcácia Silva, por me orientar não apenas no mundo acadêmico, mas na vida, sempre pressionando o meu amadurecimento intelectual e mostrando que muitas vezes as situações podem fugir do nosso controle, mas com calma e dedicação, tudo acaba bem.

À Camilla Flávia Avelino de Farias por sua amizade incondicional me incentivando a continuar nos momentos em que nem mesmo eu acreditava na minha capacidade. Por longas horas de “conversas sem futuro” e, principalmente, por SEMPRE estar disponível quando preciso de ajuda. Nossa amizade será eterna, assim como nossas aventuras juntos.

Aos meus melhores amigos, Andrwey Viana, André Tork, Thaynara Viegas, Melina Lins e Karolyne Estrela, pelo companheirismo, amizade verdadeira, presença constante e momentos mais divertidos da graduação. Amizades que pretendo levar além da universidade.

A todos os meus amigos da sala 10 por diversos momentos de descontração e companheirismo, pelos acontecimentos inesquecíveis durante esses anos e incentivo no crescimento intelectual. Vocês foram a MELHOR turma.

A todos os meus amigos da graduação que de alguma forma tornaram esses anos tão agradáveis e especiais.

À Aline Francelina de Queiros pela amizade e por abrir as portas da sua casa, em Areia, durante a realização dos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA), por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar nas mais diversas encruzilhadas da construção do conhecimento científico.

Para a realização deste trabalho, agradeço:

À Prof^a. Dr^a. Sildivane Valcácia Silva por me orientar e se disponibilizar a sair da sua casa para auxiliar os experimentos em outra cidade.

À Aline Francelina de Queiros pela ajuda na realização dos experimentos e oferecer abrigo durante os mesmos.

Ao Laboratório de Análises de Produtos de Origem Animal (LAPOA), Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário e Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA) por fornecer os equipamentos e estrutura necessária.

“I'd like to make myself believe
That planet Earth turns slowly
It's hard to say that I'd rather stay awake
When I'm asleep
Because my dreams are bursting at the seams”
Adam Young

RESUMO

Neste estudo objetivou-se avaliar os efeitos das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal na criopreservação de sêmen caprino. As amostras seminais foram obtidas de dois reprodutores (raças Saanen e Alpino Americano) através de vagina artificial. Após a colheita, os ejaculados foram avaliados quanto ao turbilhonamento, motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática e posteriormente homogeneizados para a formação do pool, e posteriormente fracionado em oito grupos experimentais: grupo controle leite centrifugado (GCL-C), diluidor à base de leite desnatado (diluidor padrão à base de leite), submetido à centrifugação; grupo controle gema centrifugado (GCG-C), diluidor à base de gema (diluidor padrão à base de Tris e gema de ovo), submetido à centrifugação; grupo teste 1 centrifugado (G1-C), diluidor à base de leite desnatado + frutose, submetido à centrifugação; grupo teste 2 centrifugado (G2-C), diluidor à base de gema + glicose, submetido à centrifugação; grupo controle leite não-centrifugado (GCL-NC), diluidor à base de leite desnatado (diluidor padrão à base de leite); grupo controle gema não-centrifugado (GCG-NC), diluidor à base de gema (diluidor padrão à base de Tris e gema de ovo); grupo teste 1 não-centrifugado (G1-NC), diluidor à base de leite desnatado + frutose; grupo teste 2 não-centrifugado (G2-NC), diluidor à base de gema + glicose. Os grupos foram submetidos a criopreservação através de curva de refrigeração de 3 h e 30 min (1 h e 30 min para redução de temperatura e 2 h de equilíbrio a 5 °C), e subsequente curva de congelamento em vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos (5 °C a -120 °C). Após descongelamento, as células foram avaliadas quanto à motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática nos tempos 0h e 2h pós-descongelamento. Para tratamento dos dados foram realizados os testes de Kolmogorov-Sminorv, ANOVA e pós-teste de Tukey, todos com significância de 5%. O grupo teste G1-NC apresentou redução significativa ($p < 0,05$) de motilidade, redução também observada nos grupos G1-C, GCG-NC e G2-NC após 2 horas de descongelamento. Esses resultados mostram que a presença de componentes do plasma seminal e a utilização da frutose foram capazes de influenciar de forma negativa a motilidade espermática de espermatozoides caprinos. Para a integridade, o grupo G1-NC apresentou redução do parâmetro, mostrando que a composição do leite quando associada ao plasma seminal e frutose, pode agir degradando fosfolipídios da membrana plasmática. Já em relação a funcionalidade da membrana plasmática, não apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos neste estudo. Assim, pode-se concluir que a retirada do plasma seminal pode ser benéfica para a célula espermática submetidas a criopreservação e que a frutose pode ser prejudicial para a manutenção da célula quando associada a fatores, como a composição do diluidor ou a presença do plasma.

Palavras-chave: diluidores de sêmen, plasma seminal, tris-gema.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of cryoprotectant combinations and seminal plasma removal on cryopreservation of goat semen. Sperm samples were obtained from two breeding herds (Saanen and American Alpine breeds) through artificial vagina. After collection, ejaculates was evaluated when to massal movement, motility, integrity and functionality of the plasma membrane and later used for the formation of eight experimental groups: centrifuged milk control group (GCL-C), extender based on skim milk (milk-based extender), with centrifugation; centrifuged yolk egg control group (GCG-C), yolk egg extender (Tris-based plus egg yolk extender), centrifuged; centrifuged test group 1 (G1-C), extender based on skimmed milk + fructose, subjected to centrifugation; centrifuged test group 2 (G2-C), yolk + glucose extender, subjected to centrifugation; non-centrifuged milk control group (GCL-NC), extender based on skim milk (standard milk-based diluent); non-centrifuged yolk control group (GCG-NC), yolk extender (standard Diluent based on Tris + egg yolk); test group 1 non-centrifuged (G1-NC), extender based on skimmed milk + fructose; non-centrifuged test group 2 (G2-NC), yolk + glucose extender. The groups were subjected to freezing through a cooled curve of 3 h and 30 min (1 h and 30 min to temperature decrease and 2 hours of equilibrium time), then submitted to freezing curve at liquid nitrogen vapor during 10 minutes (5 °C until -120 °C. After thawing, sperm cells were assessment to evaluation of motility, integrity and functionality of the plasma membrane at 0h and 2h after thawed. The G1-NC test group demonstrated lower motility ($p < 0.05$) when compared to other groups, this reduction was also observed in G1-C, GCG-NC and G2-NC groups at 2 hours of evaluation. These results demonstrated that seminal plasma components and the use of fructose were able to negatively influence sperm motility. For the integrity, G1-NC group presented a reduction of the parameter, demonstrated that the composition of the milk when associated with the seminal plasma and fructose can act by degrading plasma membrane phospholipids. Regarding the functionality of the plasma membrane, no difference ($p < 0.05$) was observed among the different treatments tested in this study. Thus, it can be concluded that the removal of seminal plasma may be beneficial to the sperm cell subjected to cryopreservation and that fructose may be detrimental to cell maintenance when associated with other factors such as the extender composition or the presence of plasma.

Keywords: Sperm extender, seminal plasm, tris-egg yolk.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Participação das regiões na produção de rebanho caprino em 2007 e 2016 | 18 |
| Figura 2 | Estrutura da célula germinativa masculina | 21 |
| Figura 3 | Representação da estrutura química do glicerol | 25 |
| Figura 4 | Representação da estrutura química do dimetilsulfóxido (DMSO) | 25 |
| Figura 5 | Representação da estrutura química do Tris | 27 |
| Figura 6 | Representação da estrutura química da D-glicose | 29 |
| Figura 7 | Representação da estrutura química da D-frutose | 29 |
| Figura 8 | Representante da raça Saanen (A) e Alpino Americano (B) | 31 |
| Figura 9 | Vagina Artificial para colheita de sêmen de pequenos ruminantes | 33 |
| Figura 10 | Posicionamento da fêmea para realização da colheita de sêmen | 34 |
| Figura 11 | Dupla coloração Eosina-Nigrosina | 35 |
| Figura 12 | Teste de funcionalidade da membrana plasmática | 36 |
| Figura 13 | Palhetas de sêmen envasadas com os grupos experimentais | 37 |
| Figura 14 | Palhetas revestidas e colocadas em recipiente com água | 38 |
| Figura 15 | Palhetas de sêmen em vapor de nitrogênio para a curva de congelamento | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Principais componentes de diferentes tipos de carne para consumo | 19 |
| Tabela 2 | Valores médios normais das características seminais de carneiros e bodes | 22 |
| Tabela 3 | Composição do diluidor padrão Tris-gema | 32 |
| Tabela 4 | Composição do diluidor padrão à base de Leite desnatado | 32 |
| Tabela 5 | Composição do diluidor teste Tris-gema | 32 |
| Tabela 6 | Composição do diluidor teste à base de Leite desnatado | 33 |
| Tabela 7 | Percentual de motilidade de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação | 40 |
| Tabela 8 | Percentual de integridade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação | 41 |
| Tabela 9 | Percentual de funcionalidade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação | 41 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|-------------------------------|
| ACPs | Agentes Crioprotetores |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EYCE | Egg Yolk-Coagulating Enzyme |
| HOST | Teste Hiposmótico |
| IA | Inseminação Artificial |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------|------------------------------------|
| °C | Graus Celsius |
| % | Porcentagem |
| < | Menor que |
| + | Mais |
| ± | Mais ou menos |
| 10 ⁶ | Milhões |
| 10 ⁹ | Bilhões |
| N ₂ | Nitrogênio |
| h | Hora |
| min | Minuto |
| g/min | Força g por minuto |
| mm/ano | Milímetros por ano |
| mL | Mililitros |
| mOsm/kg H ₂ O | Miliosmoles por quilograma de água |
| g | Gramas |
| kg | Quilogramas |
| Kcal | Quilocalorias |
| mg | Miligrama |
| μL | Microlitro |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| | 2.1. Caprinocultura | 18 |
| | 2.2. Características do Sêmen Caprino | 20 |
| | 2.3. Criopreservação e Inseminação Artificial | 22 |
| | 2.4. Crioprotetores | 24 |
| | 2.4.1. Agentes crioprotetores penetrantes (Intracelulares) | 24 |
| | 2.4.2. Agentes crioprotetores não penetrantes (Extracelulares) | 25 |
| | 2.5. Diluidores Espermáticos | 26 |
| | 2.6. Centrifugação | 27 |
| | 2.7. Importância dos Açúcares | 28 |
| 3 | OBJETIVOS | 30 |
| | 3.1. Objetivo Geral | 30 |
| | 3.2. Objetivos Específicos | 30 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| | 4.1. Localização e Período do Experimento | 31 |
| | 4.2. Animais e Manejo | 31 |
| | 4.3. Preparação dos Diluentes Convencionais e Diluentes Teste | 32 |
| | 4.4. Colheita Seminal | 33 |
| | 4.5. Sêmen Fresco | 34 |
| | 4.6. Avaliações dos Parâmetros Cinéticos Espermáticos | 34 |
| | 4.6.1. Avaliação do turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática | 34 |
| | 4.6.2. Teste de integridade da membrana plasmática | 35 |
| | 4.6.3. Teste de funcionalidade da membrana plasmática | 35 |
| | 4.7. Grupos Experimentais | 36 |
| | 4.8. Congelação do Sêmen | 37 |
| | 4.9. Avaliações Pós-descongelção | 38 |
| | 4.10. Análise Estatística | 39 |
| 5 | RESULTADOS | 40 |
| 6 | DISCUSSÃO | 42 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 45 |
| | REFERÊNCIAS | 46 |
| | GLOSSÁRIO | 54 |
| | ANEXO | 55 |

1 INTRODUÇÃO

A exploração de pequenos ruminantes domésticos, historicamente, é uma atividade de importância socioeconômica, particularmente na maioria dos países que possuem regiões de climas árido e semiárido (SIMPLÍCIO et al., 2003). Ao longo de décadas, a caprino-ovinocultura foi considerada uma atividade marginal ou de subsistência na região Nordeste do Brasil, normalmente com baixa produtividade e realizada por produtores desprovidos de capital financeiro e de recursos tecnológicos (COSTA et al., 2008).

Os caprinos representam uma espécie de expressiva importância econômica graças a sua rusticidade, que permite uma melhor adaptação às características do meio, ressaltando-se a qualidade dos produtos que fornece para a alimentação e vestuário (DUBEUF; MORAND-FEHR; RUBINO, 2004). O cultivo destes animais é visto como uma fonte sustentável com excelente possibilidade de rentabilidade econômica e estabilidade demográfica (COSTA; QUEIROGA; PEREIRA, 2009). A referida atividade representa uma das mais importantes fontes de proteína nobre de origem animal para um grande contingente da população de baixa renda. É um setor de elevada importância socioeconômica diante do grande número de ocupação, postos de trabalho e renda gerados direta e indiretamente, especialmente para pequenos produtores rurais (NOGUEIRA; FIGUEIREDO JÚNIOR; YAMAMOTO, 2010).

Nos últimos anos a demanda por produtos de origem animal de qualidade tornou-se cada vez mais visada pelo mercado consumidor, gerando a busca pela produção e processamento de alimentos cada vez mais elaborados e com certificação de qualidade (COSTA; QUEIROGA; PEREIRA, 2009), fazendo-se necessária a adição de novas tecnologias para o aperfeiçoamento e melhoramento da caprinocultura. O surgimento da possibilidade de congelar sêmen trouxe uma nova dimensão para a inseminação artificial, possibilitando, de forma maximizada, o melhoramento genético dos rebanhos, pela capacidade de aumentar a progênie por macho e em diversos lugares simultaneamente (LEBOEUF et al., 1998). Assim, a inseminação artificial caprina é um método bastante prático, global e relevante para incrementar o melhoramento genético do rebanho caprino brasileiro dentro de um curto espaço de tempo (NUNES; FELICIANO SILVA, 1984).

A adoção dessas tecnologias é imprescindível para que a caprino-ovinocultura seja inserida na economia de mercado, promovendo melhoria na qualidade de vida, particularmente do homem rural, atingindo os padrões internacionais de desenvolvimento

econômico e social (LÔBO, 2002). Por outro lado, a criopreservação pode causar alterações irreversíveis na membrana espermática, oriundas dos processos de refrigeração, congelamento e descongelamento, resultando em distúrbios na estrutura da bicamada proteico-lipídica, como um aumento da fluidez e conseqüente aumento na permeabilidade da membrana, danos acrossômicos, desidratação, liberação de enzimas e fosfolipídios, redução da atividade metabólica e diminuição no consumo de ATP. Tais alterações podem comprometer parcial ou totalmente a fertilidade do espermatozoide (FARSTAD, 1996). Por este motivo, a primeira etapa envolvida na criopreservação espermática representa a diluição das amostras seminais em meios específicos, evitando-se os efeitos deletérios relacionados ao metabolismo espermático e exposição ambiental, garantindo a manutenção do movimento celular (FOOTE, 1982).

Os diluentes de criopreservação mais utilizados para o sêmen caprino contêm gema de ovo ou leite desnatado na sua formulação. Eles são ricos em proteínas capazes de interagir com a membrana celular espermática e garantir proteção durante a criopreservação, reduzindo o choque térmico (BOUCHARD et al., 1990; PURDY, 2006; SALAMON; MAXWELL, 2000). Contudo, enzimas produzidas pelas glândulas bulbo-uretrais da espécie caprina, são responsáveis por interagir com componentes da gema de ovo e do leite, gerando produtos tóxicos para os espermatozoides (ROY, 1957; NUNES et al., 1982). Assim, o método comumente descrito para evitar as interações dessas enzimas e as proteínas presentes nesses diluidores é retirada do plasma seminal através do processo de centrifugação (PURDY, 2006).

Os açúcares são responsáveis por manter a pressão osmótica nos diluidores induzindo a desidratação celular, reduzindo a formação de cristais de gelo nos espermatozoides. Além disso, possuem a capacidade de interagir com fosfolipídios de membranas em baixa hidratação e, principalmente, de fornecer substrato energético para as células germinativas masculinas (AISEN; MEDINA; VENTURINO, 2002; PURDY, 2006). Naing et al. (2010), testando a adição de monossacarídeos e dissacarídeos na criopreservação de sêmen caprino, observaram que o açúcar mais simples, a glicose, foi responsável por parâmetros de motilidade total mais elevados quando comparado com a trealose ou sacarose, mas que não houve diferença quando se tratava da frutose. Esse resultado é atribuído principalmente a facilidade de difusão das moléculas mais simples de açúcares, garantindo o fornecimento energético para as células espermáticas.

Devido à importância econômica da caprinocultura, faz-se necessário a utilização de biotecnologias aplicadas à reprodução animal, visando o melhoramento dos

rebanhos e da qualidade dos produtos gerados. Por conseguinte, a perspectiva deste trabalho é testar diferentes composições de diluidores espermáticos com ou sem a centrifugação, em sêmen caprino submetido à congelação.

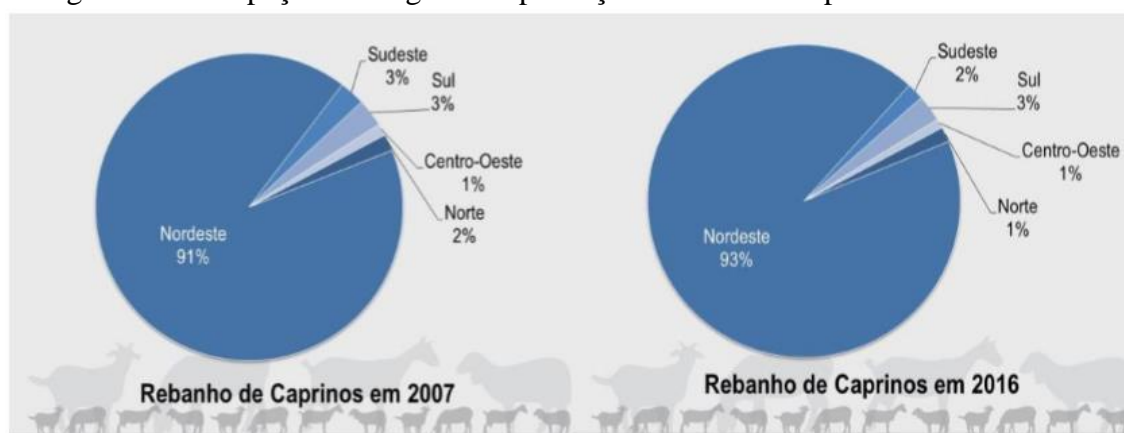
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura

A caprino-ovinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, sendo exercidos em distintos ecossistemas com os mais diferentes tipos de clima, solo, topografia e vegetação (CORREIA, 2008). Em 2014, o rebanho mundial era da ordem de 1.011.251.833 de animais, sendo, China, Índia e Nigéria os maiores detentores dos rebanhos. O Brasil aparece como o 22º rebanho mundial de caprinos com cerca de 8.851.879 animais (FAO, 2015).

Apesar do baixo nível tecnológico ainda presente em todo processo produtivo, a caprinocultura no Brasil, concentrada principalmente no Nordeste (Figura 1), tem apresentado configurações que a coloca numa posição privilegiada no cenário do agronegócio, tendo em vista sua elevada capacidade de adaptação às condições do semiárido e diversidade de produtos que podem ser explorados comercialmente, como reprodutores, carnes, pele, leite e derivados. Esta condição está respaldada no incremento do consumo interno, em demandas concretas de exportação de carne e de pele para diversos países, bem como na percepção de oportunidades de negócio que a atividade oferece (SOUZA, 2007; NOGUEIRA; FIGUEIREDO JÚNIOR; YAMAMOTO, 2010). A produção destes pequenos ruminantes vem se caracterizando como uma atividade de grande importância cultural, social e econômica para a região, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento do Nordeste (COSTA et al., 2008).

Figura 1. Participação das regiões na produção de rebanho caprino em 2007 e 2016



Fonte: IBGE (2016).

O desenvolvimento deste setor apresentou um ciclo de crescimento mundial intensificado nos últimos anos, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde são

considerados detentores de um maior número de rebanhos (MAIA; BEZERRA, 2010). As carnes ovinas e caprinas deixaram de ser um produto apreciado exclusivamente no meio rural e em pequenas cidades do interior do Sul e do Nordeste e são encontradas em supermercados, açougues e restaurantes “finos” das grandes cidades. (COUTO, 2001; BARRETO NETO, 2010). Este crescimento ocorreu graças à intensificação da pesquisa voltada para produção de animais e beneficiamento de seus produtos, crescimento do nível de organização dos produtores, aumento da absorção de novas tecnologias, maior atuação dos agentes financeiros para facilitar o acesso ao crédito e, o mais importante, aumento da demanda por produtos derivados de caprinos e ovinos (CARVALHO, 2003).

Observa-se uma crescente demanda por carnes e peles oriundas da caprinocultura. Esta situação é provavelmente decorrente do fato da carne apresentar teores de gordura saturada, gordura total, proteína, ferro e calorias em valores similares aos da carne de frango (Tabela 1) (SIMPLÍCIO et al., 2003). A procura por cortes padronizados, bem como por vísceras devidamente processadas, embaladas e comercializadas de forma refrigerada ou congelada, apresenta crescimento considerável, principalmente nas áreas habitadas pelo segmento populacional detentor de maior poder aquisitivo (CARVALHO, 2003).

Tabela 1. Principais componentes de diferentes tipos de carne para consumo

| Discriminação Carne Assada (100g) | Calorias (Kcal) | Gordura (g) | Gordura saturada (g) | Proteína (g) | Ferro (g) |
|--|----------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Ovino Lanado | 252 | 17,14 | 7,82 | 24 | 1,50 |
| Bovino | 263 | 17,14 | 7,29 | 25 | 3,11 |
| Suíno | 332 | 25,72 | 9,32 | 24 | 2,90 |
| Caprino | 131 | 2,76 | 0,85 | 25 | 3,54 |
| Frango | 129 | 3,75 | 1,07 | 25 | 1,62 |

Fonte: Adaptado de Simplício et al. (2003) apud Addizzo (1992).

A produção de peles de ovinos e caprinos, cujos atributos conferem grande aceitação nacional e internacional, tem correspondido a cerca de 20% da produção do setor de curtumes do País, revelando-se como mais um atrativo econômico ao setor (NOGUEIRA; FIGUEIREDO JÚNIOR; YAMAMOTO, 2010). As peles destes animais são valorizadas no mercado pela maior elasticidade, resistência e textura apresentadas, prestando-se, assim, para um maior número de produtos nas indústrias de vestuário e de calçados (CARVALHO, 2003).

O leite de cabra apresenta qualidades que o tornam superior ao leite bovino com relação a propriedades nutricionais e terapêuticas, como exemplos, melhor digestibilidade,

alcalinidade, teor de proteínas de alto valor nutritivo, hipoalergenicidade, entre outros, que são motivos de consumo por grupos especiais como alérgicos ao leite de vaca, idosos e crianças (GARCIA; TRAVASSOS, 2012). O mercado nacional de leite de cabra ainda está em desenvolvimento e ultimamente tem crescido devido à demanda dos consumidores dos centros urbanos e da inserção do leite na merenda escolar, especialmente do Nordeste (MARTINS et al., 2007).

Criadores capacitados vêm desenvolvendo suas atividades, não somente para a produção de carne, leite e pele, mas também se dedicando à criação de animais geneticamente melhorados para reprodução, inclusive destinados à colheita de sêmen ou transferência de embriões (NOGUEIRA; FIGUEIREDO JÚNIOR; YAMAMOTO, 2010). Para que existam esperadas melhorias faz-se necessária atenção especial aos trabalhos de seleção e cruzamento direcionados para precocidade reprodutiva, ganho de peso, melhorias para qualidades sensoriais e de acabamento da carne e resistência a parasitas (AMÂNCIO; PEREIRA, 2014). Verifica-se assim, grande potencial de mercado para a caprino-ovinocultura brasileira. Entretanto, é necessário que os sistemas de exploração sejam organizados para uma produção competitiva e em consonância com os cenários nacional e internacional (LÔBO, 2002).

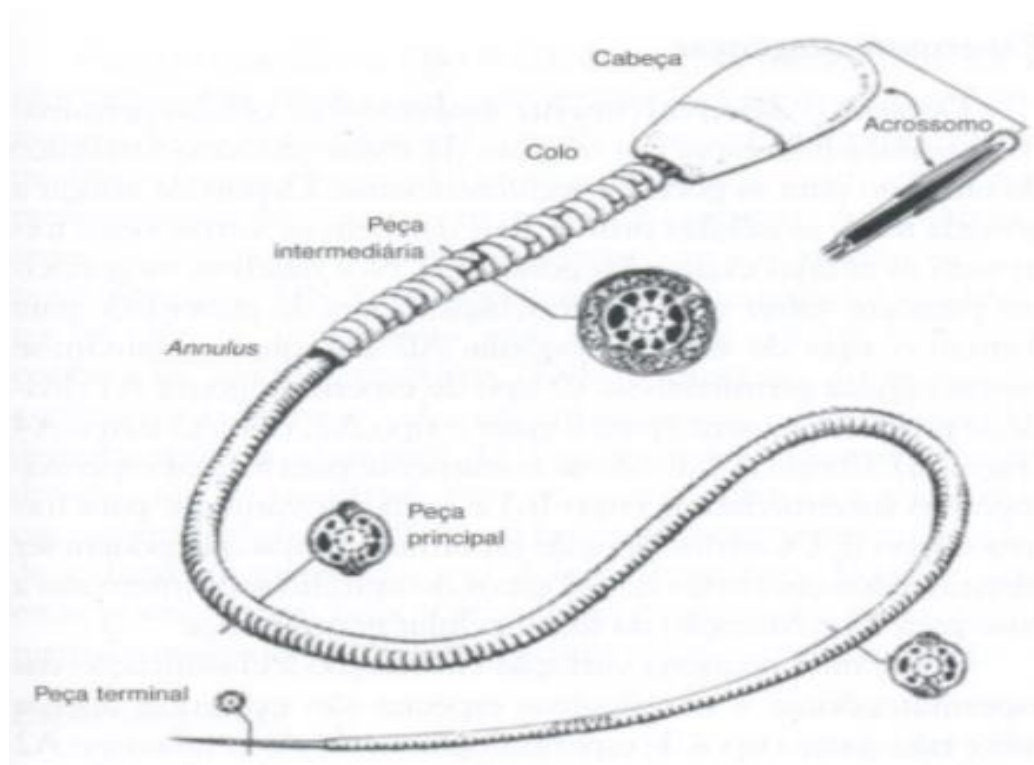
2.2 Características do Sêmen Caprino

O sêmen pode ser caracterizado como suspensão celular líquida que contém gametas masculinos altamente especializados (espermatozoides) e também secreções dos órgãos acessórios do aparelho reprodutor masculino. O plasma seminal é constituído pela porção fluida dessa suspensão, que é liberada na ejaculação. Os gametas masculinos (Figura 2) são provenientes dos túbulos seminíferos, localizados no interior dos testículos, os quais contêm uma série de complexas células germinativas em desenvolvimento, que dão origem aos espermatozoides, através de uma sequência de eventos denominada espermatogênese (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A composição do sêmen varia entre as espécies. O volume e a concentração de espermatozoides no ejaculado variam com a anatomia (tamanho do testículo) e atividade reprodutiva ou frequência de ejaculações. Além das variações individuais, fatores como idade, condições climáticas e nutrição podem afetar a quantidade e qualidade do sêmen (MAIA, 2010). O sêmen caprino apresenta algumas analogias ao do carneiro; o volume do ejaculado é relativamente baixa. As diferenças entre raças sempre estão presentes; é o caso

de bodes Alpinos, que mostram um volume de sêmen significativamente mais elevado que aquele das raças Poitevine e Saanen (CORTEEL, 1968). A concentração do sêmen varia de 1×10^9 a 3.5×10^9 espermatozoides por mL, segundo as raças, zonas geográficas e os períodos do ano (NUNES, 1982). As características médias normais do sêmen de caprinos podem ser observadas na Tabela 2.

Figura 2. Estrutura da célula germinativa masculina



Fonte: HAFEZ; HAFEZ, Reprodução Animal, 2004, p. 99.

A espécie caprina possui particularidades quanto a seu plasma seminal. Ele é rico em uma enzima denominada “egg yolk-coagulating enzyme” (EYCE), responsável por coagular a gema do ovo e interagir com os fosfolípidios dos diluidores, libera ácidos graxos, os quais são espermicidas (ROY, 1957; MAIA, 2014). Esta reação de hidrólise promove uma atividade fusogênica na membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina. Também é observado uma fração glicoproteica do plasma seminal caprino (SBUIII), também originada das glândulas bulbouretrais, que interage com o diluente à base de leite, provocando inibição da motilidade, ruptura do acrossoma e morte celular espermática (NUNES et al., 1982; CASTELO; FROTA; SILVA, 2008). Porém, estudos apontam essas duas enzimas como sendo a mesma molécula (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).

Tabela 2. Valores médios normais das características seminais de carneiros e bodes

| Característica Seminal | Carneiro | Bode |
|---|-------------------|-------------------|
| Volume (mL) | 0,8 – 2,5 (1,0) | 0,5 – 1,5 (0,8) |
| Cor | Pérola ou marfim | Amarela |
| Aspecto | Leitoso a cremoso | Leitoso a cremoso |
| Total espermatozoides/ ejaculado (bilhões) | 2 a 9 (3) | 1 a 7,5 (2) |
| pH | 5,9 a 7,3 | 6 a 7 |
| Motilidade (%) | 75 | 80 |
| Vigor (0 a 5) | 3 | 3 |
| Espermatozoides normais (%) | 80 a 85 | 80 a 90 |
| Viáveis (pós-vital) | 80 | 80 |

Fonte: MAIA, 2010.

2.3 Criopreservação e Inseminação artificial

Nos últimos anos, tem-se observado um crescente interesse em técnicas que possibilitem melhor aproveitamento do material genético oriundo de reprodutores de diferentes espécies. Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, tem-se destacado a criopreservação de sêmen, que possibilita um melhor aproveitamento de ejaculados oriundos de um mesmo reprodutor, bem como facilita a propagação deste material genético para diferentes regiões do planeta, mesmo após a morte do animal (SILVA; CARDOSO; SILVA, 2001).

A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, permitindo a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento (PEGG, 2007). O processo de criopreservação de sêmen, além de possibilitar sua utilização por longo período, reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores; favorece rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes; minimiza a possibilidade de introdução de doenças transmissíveis via sêmen numa região e/ou país e a transmissão e propagação de doenças sexualmente transmissíveis nos rebanhos (TRALDI, 1994).

A criopreservação é um processo complexo, que envolve equilibrar muitos fatores para obter resultados satisfatórios. Para garantir um sucesso mínimo é necessária a preocupação com o diluente apropriado, taxa de diluição, curva de refrigeração-congelamento e descongelamento e também a fisiologia do sêmen de cada espécie para maximizar a recuperação pós-descongelamento e conseqüentemente a fertilidade (PURDY, 2006). Tal biotécnica, quando associada à inseminação artificial (IA), representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de excelente qualidade (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).

Todavia, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen fresco. Este prejuízo surge da combinação de dois aspectos, a morte celular e danos na capacidade funcional dos espermatozoides sobreviventes (WATSON, 2000). A motilidade e a estrutura dos espermatozoides são afetadas de diferentes formas, uma vez que ocorrem injúrias simultaneamente ou nas diferentes etapas da criopreservação (GONZALEZ, 2004). As injúrias ocorridas nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides, ocasionadas pelo processo de criopreservação, são devido a alterações na temperatura e na osmolaridade do meio que provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios das membranas dos espermatozoides (CELEGHINI, 2005).

Uma preservação bem-sucedida de espermatozoides pela refrigeração, congelamento e descongelamento é dependente de uma série de fatores, como a qualidade da amostra de sêmen, adição de diluidores, padrão de diluição, tipo de tampão, crioprotetores, tempo de equilíbrio, padrão de congelamento e descongelamento. A interação desses fatores objetiva a redução do dano celular, assegurando uma sobrevivência espermática adequada *in vitro* e *in vivo* (FARSTAD, 1996).

A IA é a biotécnica de reprodução animal que visa o uso intensivo de reprodutores portadores de genes desejáveis. Essa forma de fecundação propaga os genes com maior rapidez e facilita a avaliação genética de um indivíduo de forma eficiente, quando comparada à monta natural (HERMAN; MITCHELL; DOAK, 1994). Entende-se por IA o procedimento de depositar o sêmen do macho no trato reprodutor feminino utilizando meios artificiais em lugar da cópula natural (ALVAREZ, 2008).

O uso da IA envolve uma série de fatores, destacando a genética animal e o sistema de produção como um todo, acarreta diretamente o melhoramento do rebanho em menor tempo e a baixo custo pela utilização de sêmen de reprodutores provados para

produção de leite ou carne (CARVALHO, 2013). O maior obstáculo para um uso mais abrangente da IA reside na necessidade de promover mudanças em práticas equivocadas de manejo, particularmente o manejo alimentar, evidenciadas pelos índices reprodutivos abaixo do normal. Deve-se entender que a IA constitui uma alternativa à monta natural quando estiverem solucionados os eventuais problemas de manejo. Outra limitação, igualmente importante, consiste na exigência de tempo e mão-de-obra treinada e motivada para a observação frequente do estro dos animais destinados à inseminação. A disponibilidade de ferramentas farmacológicas para induzir a ovulação em momentos pré-determinados é um grande facilitador na implementação de programas de IA, inclusive em rebanhos com grande número de animais (ALVAREZ, 2008).

2.4 Crioprotetores

A adição de protetores de criopreservação é necessária para proteger os espermatozoides durante os processos de refrigeração, bem como durante a congelamento e descongelamento (FARSTAD, 1996). Crioprotetor é a nomenclatura dada a qualquer substância que ofereça, temporariamente, energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006).

A escolha do Agente Crioprotetor (ACPs) é dependente do tipo celular a ser preservado. Para a maioria das células o glicerol é o agente de escolha porque ele é geralmente menos tóxico do que o dimetilsulfóxido (DMSO). Contudo o DMSO é mais penetrante na célula e geralmente é o agente de escolha para células mais complexas (SILVA; SANCHEZ; DÁVILA, 2003). Dependendo do local de ação, os agentes crioprotetores podem ser classificados como penetrantes ou não penetrantes.

De uma forma geral, muitas substâncias com propriedades crioprotetoras elevam a permeabilidade da membrana celular, diminuem o ponto de congelamento da água e de fluidos biológicos por meio de ações coligativas. Portanto, reduzem a concentração de sais dissolvidos em solução e evitam assim o choque osmótico (AGUIAR et al., 2012).

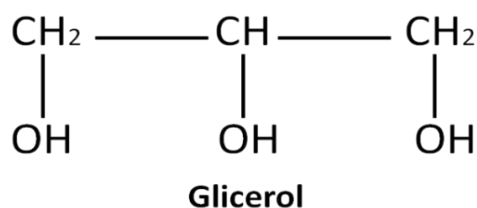
2.4.1 Agentes crioprotetores penetrantes (Intracelulares)

São agentes que possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo assim a formação de cristais de gelo, reduzindo o aumento de tamanho desses cristais, diminuindo a concentração de soluto nos

meios extra e intracelulares (DALIMATA; GRAHAM, 1997) aumentando a viscosidade da solução de congelação, consequentemente, reduzindo o ponto de congelação da mesma. Além disso, os ACPs também agem prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água (CASTRO et al., 2011).

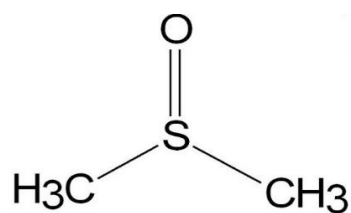
A adição de crioprotetores intracelulares tais como glicerol ($C_3H_8O_3$) (Figura 3) e dimetilsulfóxido (C_2H_6OS) (Figura 4) ao meio de congelação, resulta na congelação do meio a temperaturas mais baixas. Isso provavelmente retarda a desidratação das células e os efeitos de solução deletérios resultantes, evitando, portanto, a formação de grandes cristais de gelo (VASCONCELOS FILHO, 2010). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na preservação por congelação (AGUIAR et al., 2012).

Figura 3. Representação da estrutura química do glicerol



Fonte: <https://kimiexplorer.wikispaces.com/Glicerol>

Figura 4. Representação da estrutura química do dimetilsulfóxido (DMSO)



Fonte: http://structuresearch.merck-chemicals.com/getImage/MDA_CHEM_102952

2.4.2 Agentes crioprotetores não penetrantes (Extracelulares)

O mecanismo de ação dos agentes crioprotetores não penetrantes baseia-se na proteção dos espermatozoides contra os efeitos osmóticos durante o processo de congelação, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células levando a desidratação, ou seja, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo no compartimento intracelular. Estes são representados pelos açúcares (sacarose, trealose lactose, glicose), proteínas do leite e lipoproteínas da gema do ovo que atuam ainda na estabilização de membranas (AMANN; PICKETT, 1987).

2.5 Diluidores Espermáticos

Durante décadas diluentes e constituintes têm sido estudados e testados na congelação de sêmen de garanhões com resultados bastante variáveis em relação resultados laboratoriais de viabilidade espermática e índices de fertilidade (MEDEIROS, 2007).

Os meios utilizados para a diluição do sêmen para a criopreservação são compostos por substâncias que atuam contra os efeitos deletérios das oscilações da temperatura; em geral, utilizam-se gema de ovo, leite desnatado, açúcares, eletrólitos e glicerol em diferentes concentrações e combinações (OLIVEIRA et al., 2013).

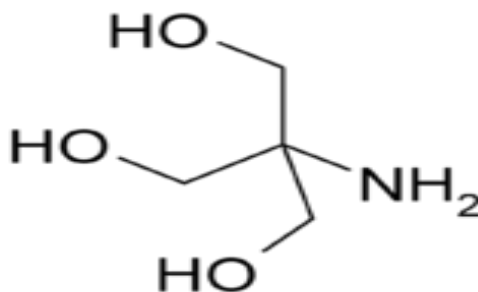
O sêmen apropriadamente diluído pode ser congelado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em uma inseminação artificial. Desse modo, faz-se necessário o uso de um bom diluidor, o qual deve conter nutrientes como uma reserva de energia, servir como tampão ajustando as alterações do pH; promover uma pressão osmótica e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos; prevenir o crescimento de bactérias; proteger as células contra o choque térmico durante o processo de refrigeração, garantir o balanço apropriado de elementos minerais, neutralizar produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, estabilizar os sistemas enzimáticos e integridade das membranas conferida por macromoléculas que as estabilizarão e minimizarão o extravasamento de íons e enzimas e possuir crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (CONCANNON; BATISTA, 1989; AMANN; PICKET, 1987).

Para melhor proteção do espermatozoide, são adicionados aos diluidores alguns tipos de crioprotetores como o glicerol, que vem sendo muito utilizado devido aos resultados positivos demonstrados. Porém, sua utilização deve ser ponderada, pois pesquisas demonstram toxicidade, o que reduz a taxa de fertilidade da inseminação (OLIVEIRA et al., 2013).

O diluente Tris-gema contém como tampão o tris ($C_4H_{11}NO_3$) (Figura 5), glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo para proteger a membrana contra o choque térmico (EVANS; MAXWELL, 1987). Durante o choque térmico, os fosfolipídios presentes na gema interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e proporcionam a proteção da mesma. As lipoproteínas ligam-se à membrana da célula espermática e ajudam a preservar a integridade celular durante o armazenamento (BOUCHARD et al., 1990).

O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação dos espermatozoides por possuir certa capacidade tampão, ação bactericida, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008). A eficiência dos meios diluentes à base de leite tem sido atribuída à sua composição proteica que atua como tampão e a propriedade quelante frente a metais pesados, havendo relatos de sua parcial proteção contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Figura 5. Representação da estrutura química do Tris



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/85/Tris.png/160px-Tris.png>

Entretanto, os diluidores devem ser escolhidos levando em consideração as particularidades do sêmen de cada espécie. O caprino é um exemplo disso, uma vez que ocorre uma interação entre as secreções das glândulas bulbouretrais e os componentes do diluidor, gema de ovo e leite, gerando substâncias tóxicas ao espermatozoide, o que não ocorre em outras espécies (MAIA, 2014). A interação tóxica com a gema de ovo é devido a uma enzima, fosfolipase A ou lecitinase, segregada pela glândula bulbouretral, que coagula a gema de ovo e hidrolisa a lecitina a ácidos graxos e lisolecitinas, que são espermicidas (ROY, 1957).

Apesar de ser grande o número de diluidores testados para a criopreservação de sêmen caprino, os métodos de congelamento e a maioria desses diluentes usados são provenientes de trabalhos realizados com bovinos, com bons resultados (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).

2.6 Centrifugação

A centrifugação é um procedimento que permite obter uma fração altamente concentrada em espermatozoides, além de eliminar o plasma seminal, que não contribui na

preservação da viabilidade espermática durante o processo de congelação (AMANN; PICKETT, 1987). Entretanto, a força de centrifugação pode influenciar na integridade do acrossoma e membrana plasmática do espermatozoide, bem como no potencial cinético, com efeitos na interação do espermatozoide com o oócito, na fertilização e na produção de embriões (MACHADO et al., 2009).

Contudo, a espécie caprina apresenta plasma seminal rico em fosfolipase A. Este, ao interagir com os fosfolípidios dos diluidores gera substâncias espermicidas (ROY, 1957). Por esse motivo, a centrifugação é o método convencional de superar as interações prejudiciais do plasma seminal e as proteínas da gema de ovo ou do leite, sendo recomendado diluir a amostra de sêmen caprino num diluente tamponado e, então, separar o plasma seminal do espermatozoide através de centrifugação (PURDY, 2006). Para minimizar os efeitos da centrifugação, recomenda-se o uso de pré-diluidores, velocidade e tempo adequados, capazes de garantir proteção às células espermáticas durante este processo (NEVES, 2009).

2.7 Importância dos Açúcares

O sêmen de mamíferos requer energia metabólica para uma variedade de funções, especialmente para a motilidade. As principais fontes de produção de adenosina trifosfato (ATP) são a fosforilação e a glicólise mitocondrial oxidativa, mas o equilíbrio entre estas duas vias varia muito entre os espermatozoides de diferentes espécies (WILLIAMS; FORD, 2001).

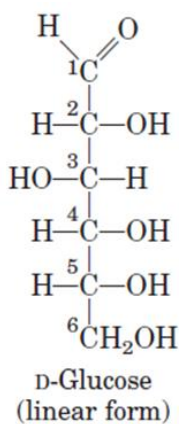
Os açúcares têm diversas funções no diluidor de sêmen, incluindo o fornecimento de substrato energético para os espermatozoides, a manutenção da pressão osmótica do meio e a atuação como um crioprotetor (BERLINGUER et al., 2007), pois promovem a desidratação celular pré-congelação, minimizando as injúrias celulares induzidas pela formação de gelo intracelular. Além disso, esses açúcares interagem com os fosfolípidios da membrana plasmática, reorganizando a membrana espermática e aumentando a sua fluidez (MOLINIA et al., 1994) o que gera uma proteção à membrana plasmática durante o período de congelamento e descongelamento, onde estão relacionadas ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolípidios (SOARES; GUERRA, 2009).

Os açúcares podem inibir os danos causados pela desidratação extrema e injúrias causadas pela formação de cristais de gelo que pode ocorrer com o processo de congelação,

devido ao fato de restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios (AISEN; MEDINA; VENTURINO, 2002). Contribuem para a estabilização da bicamada lipídica, mantem sua capacidade de transporte de cálcio, a inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídeos em fase fluida na ausência de água (CROWE et al., 1987).

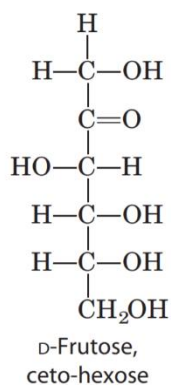
A glicose ($C_6H_{12}O_6$) (Figura 6) e a frutose ($C_6H_{12}O_6$) (Figura 7) são monossacarídeos de seis carbonos que contem cinco grupos hidroxila, sendo os açúcares mais comuns encontrados na natureza (NELSON; COX, 2014). Considera-se que a frutose é uma importante fonte de energia para os espermatozoides ejaculados (NAGAI; YAMAGUCHI; MORIWAKI, 1982) e, juntamente com a glicose, é encontrada no plasma seminal em muitas espécies de mamíferos (PONGLOWHAPAN; ESSEN-GUSTAVSSON; LINDE, 2004). A glicose e a frutose foram investigadas pelos diferentes efeitos sobre os gametas em termos de energia metabolizável e potencial de fertilidade, e os efeitos benéficos variam entre as espécies (WILLIAMS; FORD, 2001).

Figura 6. Representação da estrutura química da D-glicose



Fonte: Nelson; Cox, Princípios de bioquímica de Lehninger, 2014, p. 244

Figura 7. Representação da estrutura química da D-frutose



Fonte: Nelson; Cox, Princípios de bioquímica de Lehninger, 2014, p. 244.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal na criopreservação de sêmen caprino.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar o efeito da criopreservação de espermatozoides caprino em diluente à base de Tris-gema associado a diferentes monossacarídeos (glicose e frutose), com e sem centrifugação;
- b) Estudar o efeito da criopreservação de espermatozoides caprino em diluente à base de Leite desnatado associado a diferentes monossacarídeos (glicose e frutose), com e sem centrifugação;
- c) Mensurar o efeito da centrifugação e retirada do plasma seminal sobre os parâmetros de motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, zero e duas horas pós-descongelamento;
- d) Mensurar o efeito de diferentes combinações de crioprotetores quanto aos parâmetros de motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, zero e duas horas pós-descongelamento;

4 METODOLOGIA

4.1 Localização e Período do experimento

O experimento foi executado no Laboratório de Reprodução do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), localizado na cidade de Areia, estado da Paraíba, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). O clima do município é caracterizado como quente e úmido (do tipo As' na classificação climática de Köppen-Geiger), e situa-se a -6.96179 de Latitude, e -35.6953 de longitude; 6° 57' 42" Sul, 35° 41' 43" Oeste; com temperatura média anual de 21,7 °C e índice pluviométrico de 1305 mm/ano, concentrados no período outono-inverno, sendo junho e julho os meses de maior precipitação e umidade relativa do ar em torno de 80%.

4.2 Animais e Manejo

Foram utilizados dois reprodutores, sendo um da raça Saanen (Figura 8A) e outro da raça Alpino Americano (Figura 8B), com cerca de quatro anos de idade, histórico de fertilidade e peso médio de 55 kg. Os animais passaram por período de adaptação de aproximadamente uma semana, onde foram submetidos a regime de colheitas de sêmen e avaliações clínico-andrológicas, como proposto por Henry e Neves (1998), para comprovação de fertilidade e exclusão de patologias reprodutivas. Os animais foram mantidos em regime semiextensivo em baias individuais no setor de caprinocultura da UFPB, recebendo alimentação balanceada, água e mistura mineral completa, visando suprir os requerimentos de manutenção.

Figura 8. Representantes da raça Saanen (A) e Alpino Americano (B)



Fonte: (A) <http://chacaramilagres.blogspot.com.br/2011/02/bode-saanen-venda-reprodutor-2008.html>;
(B) https://scontent-lga3-1.cdninstagram.com/t51.2885-15/e35/22158074_935266583290864_3500959509487026176_n.jpg

4.3 Preparação dos Diluentes Convencionais e Diluentes Teste

Quatro diferentes diluidores foram confeccionados para o estudo. O diluidor padrão Tris-Gema + frutose, conforme metodologia de Hafez e Hafez (2004) apresentado na Tabela 3. O diluidor padrão Leite desnatado + glicose, segundo metodologia de Barros (2010), Tabela 4. Os diluidores testados: Tris-Gema + glicose, disposto na Tabela 5; Leite desnatado + frutose, tabela 6.

Para determinar a quantidade dos açúcares utilizados nos diluidores testados, foi calculado a massa molecular da glicose e da frutose e posteriormente realizada uma regra de três com o objetivo de adicionar a mesma disponibilidade do açúcar dos diluidores padrões.

Tabela 3. Composição do diluidor padrão Tris-gema

| Composição | Concentração |
|-----------------------|---------------------|
| Tris | 3,605 g |
| Ácido Cítrico | 2,024 g |
| Frutose | 1,488 g |
| Água destilada | 100 mL |
| Gema de ovo | 20% |
| Antibiótico | 0,003 g |
| Glicerol | 5% |
| pH | 6,8 – 7,2 |

Fonte: HAFEZ; HAFEZ, 2004 (adaptado).

Tabela 4. Composição do diluidor padrão à base de Leite desnatado

| Composição | Concentração |
|-----------------------|---------------------|
| Leite em pó | 10 g |
| Glicose | 0,194 g |
| Água destilada | 100 mL |
| Antibiótico | 0,003 g |
| Glicerol | 7% |
| pH | 6,8 |

Fonte: BARROS, 2010.

Tabela 5. Composição do diluidor teste Tris-gema

| Composição | Concentração |
|-----------------------|---------------------|
| Tris | 3,605 g |
| Ácido Cítrico | 2,024 g |
| Glicose | 0,5 g |
| Água destilada | 100 mL |
| Gema de ovo | 20% |
| Antibiótico | 0,003 g |
| Glicerol | 5% |
| pH | 6,8 |

Tabela 6. Composição do diluidor teste à base de Leite desnatado

| Composição | Concentração |
|----------------|--------------|
| Leite em pó | 10 g |
| Frutose | 578 mg |
| Água destilada | 100 mL |
| Antibiótico | 3 mg |
| Glicerol | 7% |
| pH | 6,8 |

4.4 Colheita Seminal

Antes da colheita foi realizada a higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro e higienização interna com solução fisiológica a 0,9%, evitando possíveis contaminações do meio ao sêmen. As colheitas de sêmen foram efetuadas com uso de vagina artificial (Figura 9), com o auxílio de uma fêmea em estro como manequim (Figura 10) como indicado por Memon e Ott (1986). As colheitas foram realizadas duas vezes por semana, com intervalo de um dia entre as colheitas, no período da manhã, durante três semanas, até se obter 10 ejaculados.

Figura 9. Vagina Artificial para colheita de sêmen de pequenos ruminantes



Fonte: Autor.

Figura 10. Posicionamento da fêmea para realização da colheita de sêmen



Fonte: Autor.

4.5 Sêmen Fresco

A princípio, as amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria à 37 °C e analisadas para os parâmetros macroscópicos (volume, cor, odor, aspecto) e microscópicos (turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração, integridade e funcionalidade de membranas) utilizando microscópio óptico (Olympus, São Paulo).

4.6 Avaliações dos parâmetros cinéticos espermáticas

4.6.1 Avaliação do turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática

O turbilhonamento (movimento massal) foi avaliado pela deposição de uma gota de sêmen puro (10 µL) sobre a lâmina aquecida a 37 °C e avaliado em microscópio óptico (Olympus, São Paulo) com objetiva de 4x, em escala que varia de 0 a 5. A motilidade foi realizada por avaliação subjetiva expressa em porcentagem (0-100%), sendo realizada em um microscópio óptico (Olympus, São Paulo), em objetiva de 40x, sendo usada uma alíquota (10 µL) da amostra entre a lâmina e a lamínula. A avaliação da motilidade foi expressa em porcentagem, com variação de 0-100%, considerando a média de dois avaliadores (CBRA, 2013). O vigor é referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento, classificado de 0 a 5, que foram determinados pela deposição de uma alíquota (10 µL) da amostra entre a lâmina. A concentração espermática foi obtida através de contagem em câmara de Neubauer em diluição de 1:400 em solução de formol-salina (SALAMON; MAXWELL, 2000).

4.6.2 Teste de integridade da membrana plasmática

Para este teste foi empregada dupla coloração (Figura 11) com os corantes eosina-nigrosina (CBRA, 2013). Para esta técnica foram diluídos 2,5 μL de cada grupo experimental em solução contendo 25 μL do corante e 25 μL de solução fisiológica. Após a diluição, foi realizado o estiramento com 10 μL de cada amostra e contadas 200 células, determinando-se a proporção entre células coradas e não coradas (células mortas e vivas, respectivamente) em microscópio de campo claro em aumento de 40x (MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003).

Figura 11. Dupla coloração Eosina-Nigrosina



Fonte: http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/Reproduccion_archivos/Practica%204-eval-semen.pdf

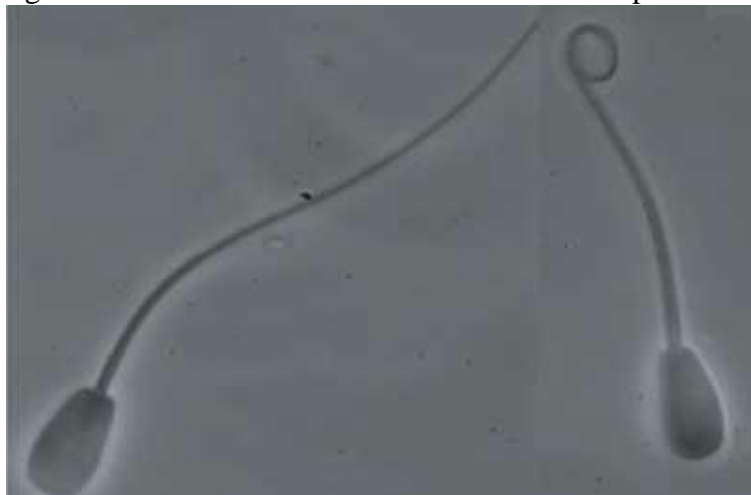
4.6.3 Teste de funcionalidade da membrana plasmática

O teste hiposmótico (HOST) visa avaliar a funcionalidade da membrana plasmática baseando-se nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular (CBRA, 2013). Foram utilizados 2,5 μL de cada grupo diluído em 100 μL de solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H_2O), composta por citrato de sódio e água destilada. A solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação foram colocados 50 μL de solução formol-salina para parar a reação osmótica dos espermatozoides.

O HOST é avaliado ao colocar 10 μL da mistura entre lâmina e lamínula e observado através de microscopia óptica com aumento de 40x. São contadas 200 células, considerando funcionais aquelas com cauda enrolada, pois as membranas funcionais absorvem a água do meio, resultando no ingurgitamento da cauda do espermatozoide (Figura

12), e não-funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada (FAGUNDES et al., 2010).

Figura 12. Teste de funcionalidade da membrana plasmática



Fonte: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=01495>

4.7 Grupos Experimentais

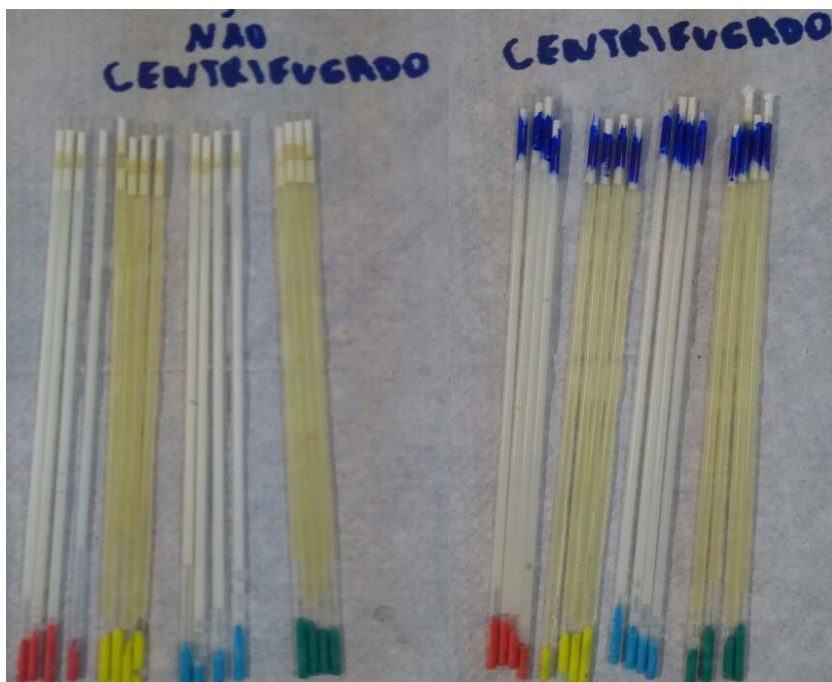
O *pool* seminal foi fracionado em oito alíquotas de igual volume, quatro amostras foram diretamente diluídas sem remoção do plasma seminal - NC (Não centrifugado) nos diferentes diluidores, na proporção 1:10 (100 μ L de sêmen para 900 μ L de diluidor). As outras quatro amostras foram submetidas ao processo de remoção do plasma - C (Centrifugado) por dupla centrifugação (800g/10min) com o tampão tris como meio de lavagem, na proporção 1:10 (100 μ L de sêmen para 900 μ L de meio) onde o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão nos diferentes diluidores.

Ao final do processo de diluição oito grupos experimentais foram constituídos:

- GCL-C (grupo controle leite; centrifugado);
- GCG-C (grupo controle gema; centrifugado);
- G1-C (leite + frutose; centrifugado);
- G2-C (gema + glicose; centrifugado).
- GCL-NC (grupo controle leite; não centrifugado);
- GCG-NC (grupo controle gema; não centrifugado);
- G1-NC (leite + frutose; não centrifugado);
- G2-NC (gema + glicose; não centrifugado);

Para cada grupo quatro palhetas de 0,25 μ L foram envasadas (Figura 13), na dose inseminante de 40×10^6 espermatozoides por palheta, como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, totalizando 32 palhetas para cada *pool*.

Figura 13. Palhetas de sêmen envasadas com os grupos experimentais



Fonte: Autor.

4.8 Congelação do Sêmen

Após envase, as palhetas foram refrigeradas utilizando curva de refrigeração caracterizada por Bispo (2005), na qual as palhetas com sêmen foram revestidas por refil (saco plástico) e colocadas dentro de recipiente plástico de aproximadamente 240 mL, contendo 120 mL de água (Figura 14). O recipiente com as palhetas foi acomodado na posição horizontal dentro da geladeira, com temperatura interna estabilizada em 5 °C. Desse modo, as amostras foram submetidas a refrigeração por 1:30 horas, até a temperatura de 5 °C. Posteriormente foram mantidas na geladeira por mais 2 horas, perfazendo o tempo total de 3:30 horas de tempo de equilíbrio, como caracterizado por (JIMÉNEZ-RABADÁN et al., 2013). Posteriormente, as palhetas foram dispostas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido a 5 cm da lâmina líquida, por 10 minutos, dentro de uma caixa de isopor (Figura 15). Passados os 10 minutos, as palhetas foram imersas no N₂ e acondicionadas em racks devidamente identificadas e estocadas em botijão criogênico a -196 °C até o momento da descongelação.

Figura 14. Palhetas revestidas e colocadas em recipiente com água



Fonte: Autor.

Figura 15. Palhetas de sêmen em vapor de nitrogênio para a curva de congelção



Fonte: Autor.

4.9 Avaliação Pós-descongelção

Para a descongelção, utilizou-se banho-maria, a 37 °C, por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram novamente reavaliadas quanto aos parâmetros cinéticos,

integridade de membranas plasmática e funcionalidade da membrana plasmática nos tempos de 0 e 2 horas pós descongelação.

4.10 Análise Estatística

Inicialmente, os dados de cinética, motilidade, integridade de membrana plasmática, e funcionalidade da membrana plasmática foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Sminorv para identificar a distribuição normal dos dados. Em sequência, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar a influência dos grupos sobre os parâmetros avaliados e se houve interferência, o teste Tukey foi realizado. Todos os testes foram realizados com significância de 5%.

5 RESULTADOS

Para o parâmetro de motilidade espermática (Tabela 7) foi observado que o sêmen fresco apresentou motilidade superior ($p < 0,05$) a todos os grupos submetidos à criopreservação. Para os diferentes diluidores, os GCL-C, GCG-C e GCG-NC diferiram ($p < 0,05$) do grupo G1-NC no tempo de análise imediata à descongelação (0h), onde G1-NC apresentou menor motilidade espermática. O GCL-C e GCG-C mostraram maior motilidade em comparação aos grupos GCG-NC e G2-NC duas horas após a descongelação (2h). Foi observado ainda diferença ($p < 0,05$) para os grupos G1-C, GCG-NC e G2-NC com relação aos dois tempos de avaliação, constatada redução da motilidade duas horas após a descongelação.

Tabela 7. Percentual de motilidade de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação

| Motilidade Espermática | | |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Sêmen Fresco | 79,70±3,03 ^a | |
| Diluidores | Tempo 0h | Tempo 2h |
| GCL-C | 33,70±6,35 ^{ba} | 21,80±11,55 ^{aA} |
| GCG-C | 34,50±9,42 ^{ba} | 21,00±11,41 ^{aA} |
| G1-C | 30,50±9,58 ^{bcA} | 8,60±4,99 ^{abB} |
| G2-C | 23,50±7,62 ^{bcA} | 9,50±6,46 ^{abA} |
| GCL-NC | 18,50±6,02 ^{bcA} | 8,80±5,48 ^{abA} |
| GCG-NC | 32,50±5 ^{ba} | 2,70±1,98 ^{bb} |
| G1-NC | 10,60±5,58 ^{ca} | 5,80±4,25 ^{abA} |
| G2-NC | 23,50±9,28 ^{bcA} | 1,70±1,09 ^{bb} |

GCL-C= Grupo controle leite centrifugado; GCG-C= Grupo controle gema centrifugado; G1-C= Grupo teste 1 centrifugado (Leite+frutose); G2-C= Grupo teste 2 centrifugado (Gema+glicose); GCL-NC= Grupo controle leite não-centrifugado; GCG-NC= Grupo controle gema não-centrifugado; G1-NC= Grupo teste 1 não-centrifugado (Leite+frutose); G2-NC= Grupo teste 2 não-centrifugado (Gema+glicose). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos.

No teste da integridade da membrana plasmática (Tabela 8) foi observado que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o sêmen fresco e o GCL-C, entretanto, o GCL-C mostrou-se significativamente mais íntegro que o grupo G1-NC imediatamente após a descongelação. Não foi observada diferença para os demais grupos experimentais.

Tabela 8. Percentual de integridade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação

| Integridade da Membrana Plasmática | | |
|---|---------------------------|-----------------|
| Sêmen Fresco | 73,35±8,85 ^a | |
| Diluidores | Tempo 0h | Tempo 2h |
| GCL-C | 47,95±11,66 ^{ab} | 33,10±15,55 |
| GCG-C | 42,30±11,49 ^{bc} | 30,20±17,21 |
| G1-C | 41,80±10,68 ^{bc} | 25,40±16,38 |
| G2-C | 36,00±12,08 ^{bc} | 26,30±13,41 |
| GCL-NC | 28,25±14,9 ^{bc} | 19,80±12,25 |
| GCG-NC | 45,20±17,68 ^{bc} | 24,25±8,72 |
| G1-NC | 17,30±10,23 ^c | 14,35±10,26 |
| G2-NC | 42,30±15,07 ^{bc} | 18,60±9,46 |

GCL-C= Grupo controle leite centrifugado; GCG-C= Grupo controle gema centrifugado; G1-C= Grupo teste 1 centrifugado (Leite+frutose); G2-C= Grupo teste 2 centrifugado (Gema+glicose); GCL-NC= Grupo controle leite não-centrifugado; GCG-NC= Grupo controle gema não-centrifugado; G1-NC= Grupo teste 1 não-centrifugado (Leite+frutose); G2-NC= Grupo teste 2 não-centrifugado (Gema+glicose). Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos.

Para o parâmetro de funcionalidade da membrana plasmática (Tabela 9), não houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais, independente do diluidor, tratamento e tempo de avaliação.

Tabela 9. Percentual de funcionalidade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação

| Funcionalidade da Membrana Plasmática | | |
|--|-----------------|-----------------|
| Sêmen Fresco | 25,37±19,44 | |
| Diluidores | Tempo 0h | Tempo 2h |
| GCL-C | 32,68±11,60 | 8,68±3,97 |
| GCG-C | 20,31±9,02 | 13,37±7,33 |
| G1-C | 18,31±9,30 | 5,37±1,61 |
| G2-C | 14,75±8,28 | 11,43±5,74 |
| GCL-NC | 29,31±18,17 | 26,50±12,39 |
| GCG-NC | 29,56±5,11 | 20,43±5,97 |
| G1-NC | 18,06±10,96 | 15,31±9,48 |
| G2-NC | 34,68±15,42 | 17,31±6,93 |

GCL-C= Grupo controle leite centrifugado; GCG-C= Grupo controle gema centrifugado; G1-C= Grupo teste 1 centrifugado (Leite+frutose); G2-C= Grupo teste 2 centrifugado (Gema+glicose); GCL-NC= Grupo controle leite não-centrifugado; GCG-NC= Grupo controle gema não-centrifugado; G1-NC= Grupo teste 1 não-centrifugado (Leite+frutose); G2-NC= Grupo teste 2 não-centrifugado (Gema+glicose).

6 DISCUSSÃO

O sêmen caprino pode ser usado a fresco (puro ou diluído), refrigerado ou congelado. O sêmen fresco e o refrigerado apresentam fertilidade mais elevada, mas de uso restrito ao período de atividade sexual dos machos, haja vista ser uma espécie que, em determinadas regiões, apresenta estacionalidade reprodutiva em virtude do fotoperíodo. Já o sêmen congelado pode ser mantido por um longo período armazenado em nitrogênio líquido, apresentando maior aplicabilidade (TRALDI, 2006).

O armazenamento do sêmen resultou em efeito negativo significativo na motilidade espermática, sendo esta uma característica esperada devido ao ambiente adverso gerado pela criopreservação. Além dos fatores inerentes ao ejaculado caprino, o processo de criopreservação de sêmen, particularmente no estado congelado, causa danos ultra estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides, reduzindo-se a motilidade, a viabilidade e o posterior transporte no trato genital feminino (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000). Além disso, a qualidade do sêmen armazenado é influenciada pelos procedimentos associados à manipulação, como diluição, centrifugação e diluente (KANKOFER et al., 2005). Estes fatores que explicam a maior motilidade no sêmen fresco observada neste estudo.

O grupo G1-NC apresentou intensa redução da motilidade, assim como, da integridade da membrana plasmática. Esse resultado pode estar relacionado com dois fatores. Primeiramente, a alta concentração de cálcio presente no leite (BARBOSA; ANDREAZZI, 2011) pode ser responsável por promover maior atividade de fosfolipases A presentes no plasma seminal caprino. As fosfolipases A são enzimas dependentes do íon cálcio, que atuam desestabilizando a membrana plasmática dos espermatozoides, assim aumentando a permeabilidade a íons da membrana e promovendo a capacitação espermática (MARTINS, 2001). Os primeiros relatos dessa enzima no plasma seminal caprino foram descritos por Roy (1957) e Nunes (1982). Ela é capaz de hidrolisar a lecitina, que é uma substância encontrada na gema do ovo e no leite, produzindo substâncias com efeitos danosos a viabilidade espermática (PELLICER-RUBIO; COMBARNOUS, 1998).

Em contrapartida, outro importante fator é o açúcar utilizado na formulação do grupo G1-NC. A frutose está presente no plasma seminal caprino (EWING; CHANG, 1986) e é utilizado como fonte principal fonte de energia pelas células espermáticas dessa espécie; possivelmente o aumento do metabolismo promovido pela capacitação espermática, que é acionada pela ação das fosfolipases A, culmina com o consumo das reservas energéticas de

frutose e exaure o espermatozoide devido à fácil biodisponibilidade desse açúcar, explicando a baixa motilidade e integridade das células deste grupo experimental.

Durante muito tempo, o plasma seminal foi considerado essencial para a sobrevivência de espermatozoides. Essa crença decorreu de observações que os espermatozoides morreram, especialmente o de bovinos, quando a concentração do meio de conservação do plasma seminal foi reduzida ao extremo por diluição excessiva do plasma seminal ou lavagem dos espermatozoides (MANN, 1964). Porém, diversos estudos mostram que a remoção do plasma seminal é benéfica para a motilidade e integridade das membranas do espermatozoide caprino refrigerado ou congelado (SALVADOR; YÁÑIZ; VIUDES-DE-CASTRO, 2006; RITAR; SALAMON, 1982).

Foi observado que os grupos GCG-NC e G2-NC apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da motilidade duas horas após a descongelação. Esses resultados podem estar relacionados com a presença do plasma seminal nesses grupos e com a alta proporção da gema de ovo utilizada na confecção dos diluidores nesse trabalho (20% de gema). A gema de ovo é uma das principais fontes de lecitina, tendo na sua composição uma variação entre 4% a 12% (WASZCZYNSKYJ, 1984). Essa concentração elevada de lecitina pode contribuir para a formação de lisolecitinas e ácidos graxos, substâncias tóxicas aos espermatozoides, por intermédio das fosfolipases A (PURDY, 2006). Segundo relatado por Ritar e Salamon (1982), o diluente a base de Tris, gema de ovo e glicerol deve ser adicionado ao sêmen sem a retirada do plasma seminal, sendo a proporção de gema de ovo e glicerol de 2 e 4%, respectivamente. Bezerra (2009), em um estudo testando efeitos de diferentes palhetas, taxas de descongelação e crioprotetores, diluiu o sêmen em Tris-gema de ovo em uma concentração de 2,5% de gema, obtendo taxa de prenhez de 42,7%.

A alta biodisponibilidade da frutose também pode explicar a redução significativa ($p < 0,05$) da motilidade observada no G1-C no tempo 2h pós-descongelação. Contudo, a ausência do plasma seminal não exerce ação direta sobre a capacitação espermática, não sendo necessário o alto consumo energético. Assim sendo, acredita-se que a frutose é consumida mais rapidamente que a glicose, por não entrar na via glicolítica, explicando uma redução acentuada da movimentação duas horas pós-descongelação.

Observou-se que o GCL-C não diferiu do sêmen fresco quanto ao parâmetro de integridade da membrana plasmática. Essa proteção está associada a proteínas presentes no leite, como a caseína, que diminuem a interação de proteínas com as membranas dos espermatozoides, diminuindo a perda de lipídios da membrana plasmática durante o

processo de criopreservação e aumentando a proteção espermática durante a refrigeração (BERGERON et al., 2007).

Para a funcionalidade da membrana plasmática não foi observada diferença significativa em nenhum dos tratamentos. Contudo, vale ressaltar que interferências dos reprodutores foram observadas no sêmen utilizado. Essa relação pode ser evidenciada pela baixa taxa de funcionalidade no sêmen fresco. A interação do efeito negativo de um reprodutor sobre os grupos experimentais pode ter influenciado os resultados obtidos, impossibilitando a ação direta dos tratamentos testados nesse estudo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados apresentados podemos observar que, devido a presença de enzimas capazes de interagir com componentes dos diluidores normalmente utilizados, o sêmen caprino apresenta melhores resultados quando o plasma seminal é previamente retirado.

A utilização da frutose como açúcar do diluidor apresentou um padrão de redução da motilidade quando foi associada ao diluidor de leite ou com a presença do plasma seminal. Mostrando que quando esse açúcar é associado a esses componentes, sua interação acaba por danificar a viabilidade espermática.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. D. A. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; TELES, C. H. A.; MARTINS, G. R.; JÚNIOR, R. Q. B., COSTA, E. C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p.80-93, 2012.
- AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, 2002.
- ALVAREZ, R. H. **Considerações sobre o uso da inseminação artificial em bovinos**. 2008. Disponível em: <http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1200068178.pdf>. Acesso em: 25 de outubro de 2017.
- AMÂNCIO, V. F. S. V.; PEREIRA, T. S. Panorama da caprinocultura de corte e leite no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da FAIT**, v.1, 2013.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-174, 1987.
- BARBOSA, C. R.; ANDREAZZI, M. P. Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.4, n.1, p.81-86, 2011.
- BARRETO NETO, A. D. Posicionamento estratégico do setor de carnes de caprinos e ovinos Ino mercado de carnes brasileiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.4, n.4, p.81-85, 2010.
- BARROS, M. S. R. M. **Avaliação in vitro do sêmen caprino criopreservado em diluente acrescido de superóxido dismutase e catalase em diferentes concentrações**. 2010. 69f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2010.
- BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v.77, p.120-126, 2007.
- BERLINGUER, F.; LEONI, G. G.; SUCCU, S.; MOSSA, F.; GALIOTO, M.; MADEDDU, M.; NAITANA, S. Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis Gmelini*

Musimon) semen during the nonbreeding season is enhanced by the use of trehalose. **Reproduction Domestic Animals**, v.42, n.2, p.202-207, 2007.

BEZERRA, F. S. B. **Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal área de concentração Produção e Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2009.

BISPO, C. A. S. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores**. Viçosa-MG, 2005, 79p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa – UFV, 2005.

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

CARVALHO, R. B. **Potencialidades dos mercados para os produtos derivados de caprinos e ovinos**. 2003. Disponível em: <http://atividaderural.com.br/artigos/4f7b556526852.pdf>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

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

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n.2, p.1-17, 2011.

CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3ª ed., 2013.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Doutorado em Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal (Tese). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo-SP, 2005.

CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. **Canine semen freezing and artificial insemination. Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice**. Philadelphia: WB Saunders Company, p.1247-1259, 1989.

CORREIA, F. W. S. Perfil setorial da caprinocultura no Mundo, Brasil, Nordeste e Sergipe – **Biblioteca Sebrae**. 17p. 2008.

CORTEEL, J. M. La reproduction de l'espèce caprine. **La Chèvre**, n.spécial, p.24, 1968.

COSTA, R. G.; ALMEIDA, C. C.; PIMENTA FILHO, E. C.; HOLANDA JUNIOR, E. V.; SANTOS, N. M. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do estado da Paraíba. Brasil. **Arquivos de Zootecnia**, v.57, n.218, p.195-205, 2008.

COSTA, R. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; PEREIRA, R. A. G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.307- 321, 2009.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER J. F.; AURELL WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v. 242, p.1-10, 1987.

COUTO, F. A. A. **Importância econômica e social da ovinocaprinocultura brasileira** In: CNPq. Apoio à cadeia produtiva da ovinocaprinocultura brasileira. Relatório Final, Brasília, 69 p., 2001.

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

DUBEUF, J. P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v.51, n.2, p.165-173, 2004.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's, artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, Sydney. Ed.2, p.194, 1987.

EWING, L. L.; CHANG, T. S. K. Physiology of male reproduction. In: Walsh, P. C. et al. (Ed.). **Campbell's Urology**. Philadelphia: WB Saunders, p.200-274, 1986.

FAGUNDES, B. T.; TILBURG, M. F. V.; SILVA, J. F. S.; SHIMOYA, A.; BARRETO, M. A. P.; FERREIRA, V. M. Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.273-278, 2010.

FAO. FAOSTAT. **Production live animals**. 2015. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.251-260, 1996.

FOOTE, R. H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. **Journal of Andrology**, v.3, p.85-100, 1982.

GARCIA, V. T.; TRAVASSOS, A. E. R. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.67, n.386, p.81-88, 2012.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozóide bovino**. 2004. Tese – (Doutorado) Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed., Barueri-SP: Manole, 513p, 2004.

HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. ED.2. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p, 1998.

HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. 8.ed. Danville: Interstate Publishers, 382p, 1994.

JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ÁLVARO-GARCÍA, P. J.; OLMO, E.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck sêmen collected by electroejaculation. **Cryobiology**, v.67, p.251–257, 2013.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 C. **Theriogenology**, v.63, p.1354-1365, 2005.

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**, v.55, p.193-203, 1998.

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

LÔBO, R. N. B. **Melhoramento genético de caprinos e ovinos: desafios para o mercado**. Embrapa Caprinos, Sobral-CE. 36p, 2002.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289–1297, 2009.

MAIA, M. S. **Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos**. 13th ed. EMPARN, Natal, RN. 2010.

MAIA, M.S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. Anais do VII CONERA. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, p.389-395, 2014.

MAIA, K. M.; BEZERRA, A. C. Controle do ciclo estral em caprinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v 4, p.14-19, 2010.

MANN, T. **The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract**, Methuen, London, 493p. 1964.

MARTINS, E. C.; WANDER, A. E.; CHAPAVAL, L.; BOMFIM, M. A. D. O mercado e as potencialidades do leite de cabra na cidade de Sobral: a visão do consumidor. In: Congresso Brasileiro de Sistemas de Produção, 7. 2007, Fortaleza. **Agricultura familiar, políticas públicas e inclusão social: Anais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 15 f., 2007.

MARTINS, L. F. **Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça parda alpina**. 2001. 84p. Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG. 2001.

MEDEIROS A. S. L. **Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores.** 2007, 123f. Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Tese). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu-SP. 2007.

MEMON, M. A.; OTT, R. S. Methods of pregnancy diagnosis in sheep and goats. **The Corneel Veterinary**, v 70, n.3, p.226-231, 1986.

MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; CASARES, P. I.; MAXWELL; W. M. C. Effect of monosaccharide and disaccharides in TRIS-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.113–122, 1994.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Sperm evaluation of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849), after thawing. **Revista Brasileira de Zootecnia - Brazilian Journal of Animal Science**, v.32, p.1810-1814, 2003.

NAGAI, T.; YAMAGUCHI, K.; MORIWAKI, C. Studies on the effects of sugars on washed human sperm motility. **Journal Pharmacology Dynamics**, v.5, p.564–570, 1982.

NAING, S. W.; WAHID, H.; MOHD AZAM, K.; ROSNINA, Y.; ZUKI, A. B.; KAZHAL, S.; BUKAR, M. M.; THEIN, M.; KYAW, T.; SAN, M. M. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.122, n.1, p.23-28, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos e Glicobiologia. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap.7, p.243-280.

NEVES, M. M. **Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino.** 2009. 116p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2009.

NOGUEIRA FILHO, A.; FIGUEIREDO JÚNIOR, C. A.; YAMAMOTO, A. **Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos na área de atuação do BNB.** Banco do Nordeste do Brasil. n.27, 128 p., 2010.

NUNES, J.F., CORTEEL, J.M., COMBARNOUS, Y., BARIL, G., 1982. Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozooids de bouc. **Reproduction Nutrition Development**, v.22, p.611–620, 1982.

NUNES, J. F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. Sobral: EMBRAPA – CNPq, 41p. 1982.

NUNES, J. F.; FELICIANO SILVA, A. E. D. Tecnologia Do Sêmen Resfriado Em Caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.8, n.2, p.121-127, 1984.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B. M. M.; CELEGHINI, E.C.C.; FERNANDES, C. B.; MATTOS, C. B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, 2013.

PEGG, D. E. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. **Molecular Biology**. 2 ed. Totowa: Human Press Inc., 348p. 2007.

PELLICER-RUBIO, M. T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.95-105, 1998.

PONGLOWHAPAN, S.; ESSEN-GUSTAVSSON, B.; LINDE, F. C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v.62, p.1498–1517, 2004.

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

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.35, p.305–312, 1982.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SALVADOR, I.; YÁÑIZ, J.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. **Theriogenology**, v.66, p.974–981, 2006.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Criopreservação de sêmen canino: revisão. **Ciência Animal**. v. 11, n. 2, p.119-129, 2001.

SILVA, R. A. M. S.; SANCHEZ, V.; DÁVILA, A. M. R. **Metodologia da criopreservação dos *Trypanosomas evansi* e *Trypanosoma vivax***. Corumbá: Embrapa Pantanal. 3p. 2003.

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

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p. 53-63, 2009.

SOUZA, W. H. O Agronegócio Da Caprinocultura De Corte No Brasil. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v.1, n.1, p.51-58, 2007.

TRALDI, A. S. **Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos** – Manual técnico. Texto apostilado, 1994.

TRALDI, A.S. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: **Proceedings of the 3rd International Fair of Goats and Rams**, São Paulo, Brasil, 2006.

VASCONCELOS FILHO, W. F. **Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino**. Pós-Graduação em Zootecnia (Dissertação). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

WASZCZYNSKYJ, N. Lecitina. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v.2, n.2, p.41-51, 1984.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492. 2000.

WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. L. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.22, p.680–695, 2001.

GLOSSÁRIO

| | |
|------------------------|--|
| Biotécnicas | Técnicas/protocolos associados com o conhecimento biotecnológico. |
| Caprinocultura | Ciência que trata do estudo e da criação de cabras; conjunto de conhecimentos sobre a criação de caprinos; Criação de caprinos. |
| Centrifugação | Separação pela força centrífuga. |
| Crioprotetor | Qualquer substância que ofereça energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada. |
| Diluição | É o ato físico-químico de tornar uma solução menos concentrada. |
| Ejaculado | Flexão de ejacular. Libera o sêmen em um ato sexual. |
| Enzima | Proteínas catalisadoras das reações químicas. |
| Espermicida | Qualquer substância que atuam de forma destrutiva aos espermatozoides. |
| Estro | Conjunto de fenômenos e comportamentos que precedem e acompanham a ovulação nos mamíferos de sexo feminino; CIO. |
| Frutose | Açúcar presente nas frutas. |
| Glicose | Açúcar que representa a principal fonte de energia para os organismos vivos. |
| Monossacarídeo | Carboidratos simples com apenas uma molécula de açúcar. |
| Motilidade | Competência para se mover; mobilidade. |
| Turbilhonamento | Comportamento de movimentação em massa de espermatozoides devido à alta concentração celular e baixa quantidade de fluidos. |

ANEXO I - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA OS TESTES

Preparação para 100 mL de Eosina-Nigrosina

| COMPONENTES | QUANTIDADE |
|------------------|------------|
| Eosina | 1 g |
| Nigrosina | 5 g |
| Citrato de Sódio | 3 g |
| Água destilada | 100 mL |

Preparação para 100 mL de Solução Hiposmótica (50 mOsm/Kg H₂O)

| COMPONENTES | QUANTIDADE |
|------------------|------------|
| Citrato de sódio | 0,464 g |
| Água destilada | 100 mL |