

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA

Dissertação

Efeito do Plasma Seminal e da Concentração de Gema
de Ovo na Criopreservação de Sêmen Caprino

Valéria da Silva Ferreira

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL E DA CONCENTRAÇÃO DE
GEMA DE OVO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
CAPRINO**

Valéria da Silva Ferreira

Sob a orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

e Co-orientação do Professor
Carlos Elycio Moreira da Fonseca

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro/2013

BIOGRAFIA

VALÉRIA DA SILVA FERREIRA, filha de José Maria da Silveira Ferreira e Maria do Socorro da Silva Ferreira, nasceu em 23 de maio de 1986, no município de São João de Meriti, estado do Rio de Janeiro. Coursou até a 5^o série do ensino fundamental no Colégio Santa Maria entre os anos de 1991 e 1997; cursou da 6^o a 8^o série no Colégio Guararapes entre os anos de 1998 e 2000 e cursou o ensino médio no Colégio GPI (Saint Peter) entre os anos 2001 e 2003.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2006, no curso de Zootecnia, concluindo o mesmo em 2010.

Durante a graduação, realizou estágio no setor de Equinocultura do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, nos anos de 2006 a 2008. Fez estágio no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DRAA) do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no período de abril a julho de 2008, sob a orientação do professor José Eugênio Trés. Entre 2008 e 2010 foi estagiária do professor Marco Roberto Bourg de Mello no mesmo departamento. Foi bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq nos anos de 2009 a 2011, sob a orientação do professor Marco Roberto Bourg de Mello.

Participou de projetos de pesquisa e publicações na área de Reprodução Animal, com ênfase nas áreas de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução em Bovinos e Caprinos, assim como frequentou cursos e eventos científicos realizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e externamente.

Ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Conceito CAPES 4), nível Mestrado, na área de concentração em Produção Animal, sob a orientação do professor Marco Roberto Bourg de Mello, em março de 2011, recebendo bolsa CAPES.

“Fechei os olhos e pedi um favor ao vento: Leve tudo o que for desnecessário. Ando cansada de bagagens pesadas... Daqui pra frente apenas o que couber na bolsa e no coração”

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Maria da Silva Ferreira (in memoriam) e Maria do Socorro da Silva Ferreira que sempre me mostraram que o caminho do estudo e da honestidade é o caminho mais correto a ser seguido. À minha irmã Verônica da Silva Ferreira pelo encorajamento e incentivo nos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me acompanhar nesta jornada me dando força e coragem para enfrentar os problemas a cada dia, por me guiar e me ensinar qual caminho devo seguir;

Ao Professor Dr. Marco Roberto Bourg de Mello, pela orientação, amizade, paciência, conselhos, apoio profissional e confiança depositada em mim e, principalmente, pelo exemplo de integridade e profissionalismo;

Ao Professor Dr. Carlos Elycio Moreira da Fonseca do DPA/IZ/UFRRJ, pela orientação, amizade, estímulo, conselhos e exemplos dados;

À minha mãe Maria e a minha irmã Verônica, por acreditarem no meu potencial, pelo apoio, carinho e a paciência que tiveram e por compreender a ausência sempre que necessário;

Ao meu tio Orlando (*in memoriam*) e à tia Darci, por me apoiarem na decisão de ser Zootecnista e por fazer Pós-Graduação, pelo carinho de pais que sempre tiveram por mim e pela preocupação que sempre sentiram pela minha ausência;

À amiga do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária/UFRRJ, Ana Paula Toledo Barbosa da Silva, pelas conversas sobre reprodução, pelo apoio no mestrado, pelos conselhos e ótima convivência;

À amiga do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia/UFRRJ, Raquel Rodrigues da Costa Mello, pelas conversas sobre projetos e vida acadêmica, pelos conselhos, incentivos e ótima convivência;

Aos estagiários e amigos do Setor de Reprodução Animal da UFRRJ: Állan César Ferreira Dias, Jéssica Machado Cardoso, Rebecca Barbosa Silva e Wagner Pereira Martins Júnior pela paciência e preciosa ajuda na execução de toda parte experimental deste projeto;

Às amigas/irmãs do alojamento F1-37 Alessandra, Adriana, Danielle e Lívia, pelo apoio, amizade, carinho e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos;

Aos amigos queridos Túlio Leite, Murilo Thuller, Magno Roza, Felipe Dilelis e Felipe de Almeida, pelos ótimos momentos de amizade e companheirismo na Graduação e na Pós-Graduação;

Aos funcionários do Setor de Reprodução e Avaliação Animal: Zico, Peixeiro, Raminho, Zezinho e Reneu, por me apoiarem no experimento e por me passarem ensinamentos através de longas conversas;

À Professora Dra. Ana Lúcia Puerro de Melo do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, pela análise estatística dos resultados e pela paciência em resolver as minhas dúvidas;

Aos professores do Setor de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, Prof. José Eugênio Três, Prof. Júlio César Ferraz Jacob e à Profa. Vera Lúcia Teixeira de Jesus, pela contribuição e convívio durante todo este período;

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização do curso;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação profissional.

Resumo

FERREIRA, Valéria da Silva. **Efeito do plasma seminal e da concentração de gema de ovo na criopreservação de sêmen caprino**. 2013. 30p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A caprinocultura atua como importante instrumento em ações de desenvolvimento social, sobretudo pelo fato dos caprinos possuírem fácil adaptabilidade e grande importância como fonte de alimentação para as populações carentes, principalmente em regiões tropicais e secas do país. Nesse contexto, a intensificação do manejo reprodutivo e o melhoramento genético constituem etapas fundamentais para a expansão da atividade, sendo a criopreservação de sêmen uma importante biotécnica reprodutiva, tendo em vista que promove a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado. O sêmen caprino possui uma particularidade importante a ser considerada para sua criopreservação visto que a interação do plasma seminal com a gema de ovo, substância amplamente empregada na composição de diluentes, pode ser deletéria ao espermatozoide dessa espécie. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos da gema de ovo e do plasma seminal sobre a viabilidade de sêmen caprino criopreservado. Foram utilizados quatro bodes adultos da raça Saanen, com idade variando entre 10 meses e 1 ano, com peso variando entre 18 e 25 kg alojados no setor de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. O sêmen de cada bode foi coletado pelo método da vagina artificial no final da estação reprodutiva. Após a análise do sêmen de cada animal individualmente, foi feito um *pool* dos três melhores ejaculados, onde foram reavaliados a motilidade, o vigor e determinada a concentração espermática. O diluidor utilizado foi o citrato gema, onde foi dividido em duas alíquotas iguais, em uma das amostras foi adicionado 5% de gema (0,25 mL gema : 47,5 mL solução citrato) e na outra foi adicionado 10% de gema (0,5 mL gema : 45,0 mL solução citrato). O sêmen foi criopreservado pelo método tradicional da geladeira e vapor de nitrogênio líquido (N₂L). Após um tempo mínimo de 24h em N₂L foi feita a descongelação. Foram avaliados a motilidade e o vigor pós-descongelamento e pós teste de termorresistência (TTR) sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste F, a 5,0% de probabilidade pelo programa SAS. Houve diferença estatística significativa entre os dados analisados ($p < 0,05$). O grupo que apresentou melhores resultados foi o de 10% de gema no diluidor citrato sem a remoção do plasma (motilidade e vigor pós-descongelamento: 30,8% e 3,3 respectivamente; motilidade e vigor pós TTR rápido e lento, respectivamente, 4,4%; 1,9 e 19,5%; 2,7). Pelos resultados do presente trabalho, conclui-se que a remoção do plasma seminal e a utilização de um diluidor com baixa concentração de gema foram prejudiciais à criopreservação do sêmen caprino.

Palavras-chave: bode, centrifugação, diluidor.

Abstract

FERREIRA, Valéria da Silva. **Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of buck semen**. 2013. 30p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Goat farming acts as an important tool in social development activities, especially for easy adaptability of goats and for possess great importance as a source of food to needy populations, mainly in tropical and dry country. In this context, the intensification of reproductive management and breeding are critical steps for the expansion of that activity, and semen cryopreservation is an important reproductive biotech, considering that it promotes conservation of male germplasm by an undetermined period of time. The goat semen has an important feature to be considered for cryopreservation in view of the fact that the seminal plasma interaction with the egg yolk, a substance frequently used in the composition of extenders, may be deleterious to sperm of that species. Therefore, the aim of this study was to evaluate in vitro, the effects of egg yolk and seminal plasma on the viability of cryopreserved goat semen. Four fertile male goats (Saanem breed), aged between 10 months and 1 year, weighing between 18 and 25 kg housed in the Animal Reproduction Facility belonging to Animal Science Institute of UFRRJ were used in this experiment. Semen was collected from each goat with artificial vagina method during the breeding season (June-July). The extender used was the yolk citrate, where it was split into two equal aliquots, in one of the samples was added 5% egg yolk (0.25 mL egg yolk: 47,5 mL citrate solution) and in another was added 10% egg yolk (0.5 mL egg yolk: 45,0 mL citrate solution). Semen was cryopreserved using traditional refrigerator and liquid nitrogen vapor (N₂L). After a minimum of 24 hours in N₂L, the straws were thawed. The motility and vigor after thawing and post thermoresistance test (TTR) were evaluated and the data submitted to analysis of variance and means were compared by the F test, at 5.0% probability by SAS. There were statistically significant differences between the data analyzed ($p < 0.05$). The group with the best results was a 10% egg yolk citrate in extender without removal of plasma (Sperm motility after thawing: 30.8% and 3.3; motility and vigor after rapid and slow TTR, respectively, 4.4%, 1.9% and 19.5; 2.7). From the results of this study it is concluded that the removal of seminal plasma and diluting with use of a low concentration of egg yolk were detrimental for cryopreservation of goat semen.

Keywords: extender, goat, centrifugation.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Divisão do sêmen dos bodes Saanem (“pool”) com e sem plasma seminal e adição do diluidor com diferentes porcentagens de gema.....11
- FIGURA 2.** Valores do efeito do plasma seminal em “pool” criopreservado do sêmen dos quatro reprodutores Saanem sobre as características MTTRR, MTTRL1 hora, VTTRL1 hora, MTTRL 2horas 14
- FIGURA 3.** Valores do efeito de porcentagem de gema em pool do sêmen dos quatro reprodutores jovens no diluidor citrato-gema com 10% e 5% de gema sobre as características MTTRR, MTTRL 1 hora, VTTRL 1 hora, MTTRL 2 horas. 16
- FIGURA 4.** Valores para motilidade (%) pós-descongelamento no sêmen com e sem plasma e nas duas porcentagens de gema (5% e 10%) dos quatro reprodutores Saanem.....17
- FIGURA 5.** Valores de vigor pós-descongelamento, vigor pós TTR Rápido, vigor pós TTR lento 2 horas do sêmen com e sem plasma e nas duas porcentagens de gema (5% e 10%) para o sêmen dos reprodutores Saanem..... 18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Esquema do revezamento na coleta dos bodes	10
TABELA 2. Valores de média e desvio-padrão do volume, motilidade e vigor do sêmen fresco de cada bode da raça Saanen utilizado no experimento	12
TABELA 3. Valores de motilidade (%) e concentração espermática (sptz/mL) do “pool” dos ejaculados dos bodes jovens Saanen	13
TABELA 4. Resumo da análise de variância para motilidade e vigor após descongelamento (MPD e VPD), após TTR rápido (MTTRR e VTTRR), após TTR lento de 1h (MTTRL1 e VTTRL1) e após TTR lento de 2h (MTTRL2 e VTTRL2).....	13

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Inseminação Artificial	2
2.2	Criopreservação de Sêmen	3
2.3	Diluidores Usados na Criopreservação	4
2.4	Efeito do Plasma Seminal	8
3	MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1	Local do Experimento e Período	9
3.2	Animais e Manejo	9
3.3	Delineamento Experimental	9
3.4	Coleta de Sêmen.....	10
3.5	Análise do Sêmen.....	10
3.6	Centrifugação e Diluição.....	10
3.7	Criopreservação Seminal.....	11
3.8	Descongelamento do Sêmen e Testes de Termo Resistência Rápido e Lento	12
3.9	Análise Estatística	12
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1	Sêmen Fresco	12
4.2	Sêmen Congelado.....	13
5.0	CONCLUSÃO	19
6.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ANEXOS	26
ANEXO A	26
ANEXO B	26
ANEXO C	27

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura e a ovinocultura têm se destacado no agronegócio brasileiro. Em 2011, o efetivo de caprinos foi de 9,379 milhões de cabeças (IBGE, 2011). No Brasil, a maior parte da população caprina encontra-se na região Nordeste, sendo que o principal objetivo da caprinocultura é a produção de carne, leite e pele. Entretanto, a caprinocultura vem ganhando espaço na região Sudeste principalmente em cadeia produtiva, sendo o terceiro maior produtor, ficando atrás apenas do Nordeste e do Sul, produzindo raças especializadas em produção leiteira.

Diversos criatórios trabalham com raças importadas mundialmente reconhecidas como grandes produtoras, dentre elas a raça Saanen e a raça Boer. Porém o material genético que vem para o Brasil tem sido mostrado muito heterogêneo.

A caprinocultura atua como importante instrumento em ações de desenvolvimento social, sobretudo por essa espécie ter a facilidade de se adaptar a diversos ambientes e a sua grande importância como fonte de alimentação às populações, principalmente no Nordeste do país.

Na produção em escala, a produtividade dos rebanhos, a precocidade do animal ao abate, a qualidade do produto final e a eficiência reprodutiva são entraves no Brasil para uma maior rentabilidade e conseqüentemente um crescimento deste segmento da pecuária. A intensificação do manejo reprodutivo e o melhoramento genético são fundamentais para a expansão da atividade de forma competitiva, sendo ferramentas otimizadoras os programas de reprodução assistida e o uso de biotécnicas da reprodução (BICUDO et al., 2003).

Algumas biotécnicas têm sido empregadas para a obtenção de avanços genéticos em caprinos, dentre elas destacam-se: inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e mais recentemente, a produção *in vitro* de embriões (PIV). Dentre estas, a IA é a biotécnica mais prática e econômica, quando bem utilizada, sendo seu conhecimento de fácil acesso, o que leva a obtenção de grande número de técnicos e profissionais capacitados atuando nesta área.

Sabe-se que a criopreservação do sêmen é um processo complexo que envolve o balanço de muitos fatores, tendo em vista a obtenção de resultados satisfatórios. O sucesso depende do conhecimento não somente do diluidor e do crioprotetor apropriado, das taxas de diluição, resfriamento ou descongelamento, mas também do conhecimento da fisiologia espermática da espécie, que é essencial para a recuperação espermática máxima após a descongelamento e, conseqüentemente, para a obtenção de altas taxas de fertilidade (PURDY, 2006).

Mesmo proporcionando muitas vantagens, ainda existem limitações quanto ao uso do sêmen criopreservado, pois o poder fecundante dos espermatozoides congelados é menor em comparação ao sêmen fresco (SALAMON; MAXWELL, 1995; SALAMON; MAXWELL, 2000; ANEL et al. 2006). Isto porque durante o processo de congelamento podem ocorrer lesões à estrutura espermática, principalmente a desestabilização das membranas celulares. Danos que por muitas vezes são irreversíveis, diminuindo a viabilidade dos gametas (HOLT, 2000).

A criopreservação de sêmen, quando associada à inseminação artificial, representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de excelente qualidade. Muitos diluidores são utilizados na criopreservação de sêmen caprino, como por exemplo, o Citrato-gema e o Tris-gema. A quantidade extra dessa substância favorece a estabilidade da membrana celular contra o choque térmico durante o processo de resfriamento e de congelamento (WATSON, 1995; BISPO, 2009).

O sêmen caprino possui uma particularidade a ser considerada para sua criopreservação, sendo que a interação do plasma seminal com a gema de ovo pode ser prejudicial ao espermatozoide dessa espécie. Isto ocorre pelo líquido seminal possuir uma

enzima secretada pelas glândulas bulbo-uretrais, que na presença da gema forma lisolecitinas através de hidrólise, sendo tóxicas ao espermatozoide (ROY, 1957; citado por BRITO, 2008).

Mais pesquisas são necessárias para avaliar a interação do plasma com a gema de ovo no diluidor, pois muitos trabalhos avaliaram que a remoção do plasma é benéfica em relação à utilização do diluidor contendo gema (USTUNER et al. 2009). Em contrapartida, neste trabalho, assim como de outros autores, foi observado que a utilização do sêmen caprino não centrifugado em diluidor contendo gema promoveu melhores resultados *in vitro* em comparação ao sêmen centrifugado (CABRERA et al., 2005).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar, por meio de testes *in vitro*, o efeito do plasma seminal e de diferentes porcentagens de gema de ovo sobre a viabilidade do sêmen caprino criopreservado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inseminação Artificial

A inseminação artificial é a técnica reprodutiva de maior relevância para o melhoramento genético dos rebanhos, tendo por objetivo a utilização do ejaculado de um macho com características produtivas superiores, em um grande número de fêmeas (AISEN, 2008). A Inseminação Artificial (I.A.) consiste na retirada ou coleta do sêmen do reprodutor e sua posterior deposição na genital da fêmea. A coleta seminal pode ser feita com o auxílio de uma vagina artificial ou eletroejaculador (RIBEIRO, 1997; GRANADOS et al. 2006). Em cabras, a inseminação geralmente é realizada pela técnica transcervical (intra-uterina). Para inseminar é necessária a utilização de um espelho, onde o óstio cervical caudal é localizado e com um aplicador, os anéis cervicais podem ser ultrapassados para que o sêmen seja depositado diretamente no corpo do útero (VARAGO et al., 2009).

No entanto, a inseminação artificial em pequenos ruminantes ainda não é utilizada na mesma proporção que em bovinos, e isto provavelmente se deve à peculiaridade anatômica da cérvix, dificultando sua transposição e requerendo mão de obra treinada para executá-la de forma segura (VARAGO et al., 2009).

A inseminação é uma poderosa ferramenta populacional, responsável pela elevação da produtividade, através da seleção de reprodutores submetidos ao teste de progênie, que usados como doadores de sêmen vem acelerando o ganho genético na população caprina (SOLANO et al., 1999; SANTOS, 2007).

Para a inseminação artificial, o sêmen caprino pode ser usado a fresco (podendo ser puro ou diluído), resfriado ou criopreservado. O sêmen fresco e o resfriado apresentam fertilidade mais elevada, porém apresentam um uso restrito devido ao tempo de utilização (em média até 48 horas após a coleta) e ao período de atividade sexual dos machos, haja vista ser uma espécie que, em determinadas regiões, apresenta estacionalidade reprodutiva em virtude do fotoperíodo (atividade sexual aumentada em dias com fotoperíodo decrescente). Já o sêmen criopreservado pode ser mantido por um longo período armazenado em nitrogênio líquido, apresentando maior aplicabilidade (TRALDI, 2006, apud CASTELO et al. 2008).

2.2 Criopreservação de Sêmen

O primeiro relato de sucesso da criopreservação de sêmen caprino é atribuído à Polge e Smith em 1950, (BEZERRA, 2009), sendo que nestes primeiros trabalhos, os autores registraram baixa fertilidade pós-descongelamento. Este é um dos problemas que limita a utilização prática do sêmen caprino criopreservado, sendo, motivo de muitas investigações em todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF et al., 2000).

Uma das limitações na criopreservação do sêmen caprino é a idade do animal utilizado no processo. O início da atividade sexual é marcada pela apresentação de instintos reprodutivos (monta em machos e fêmeas e interesse sexual pelas fêmeas), mesmo antes de atingirem a puberdade total, sendo alcançada quando os espermatozoides estiverem viáveis para fecundação. Embora os machos possuam produção de espermatozoides por volta dos 4 meses de idade, ou seja, já sendo capazes de fecundar, é recomendado usá-los na reprodução a partir dos 8 ou 9 meses, ou quando atingirem mais de 70% do peso adulto. Isto porque ainda poderá estar produzindo espermatozoides com defeitos e em concentrações inadequadas (GRANADOS et al. 2006). Santos et al. (2006) verificaram que a qualidade do sêmen caprino congelado foi influenciada pela idade dos animais. A motilidade espermática progressiva assim como o vigor foram maiores nos animais jovens (11 e 12 meses) quando comparados aos mesmos parâmetros nos animais adultos (51 e 65 meses). Os autores atribuíram a menor motilidade pós-descongelamento apresentada pelos animais adultos ao volume seminal que teve correlação negativa com a congelamento de sêmen.

A congelamento de sêmen permite facilitar o uso da inseminação artificial, o armazenamento e intercâmbio deste material entre propriedades, bem como permite utilizar os reprodutores em um número muito maior de fêmeas do que seria obtido em regime de monta natural. A inseminação artificial com sêmen congelado pode também evitar a disseminação de doenças infecciosas, pois os animais de centrais passam por avaliações para detecção de doenças e os antibióticos adicionados ao diluidor proporcionam um controle microbiológico eficiente (XAVIER et al., 2009).

A criopreservação de sêmen também favorece o armazenamento de material para programas de inseminação fora da estação reprodutiva, uma vez que diversas raças de caprinos são estacionais e o volume e a qualidade do sêmen tendem a diminuir fora da estação reprodutiva (THIMONIER, 1981; VARAGO et al., 2009). Permite a utilização de um menor número de reprodutores no rebanho reduzindo assim os custos com o plantel, facilitando a utilização de fêmeas na época mais favorável para a fertilização.

A criopreservação do sêmen caprino permite um progresso genético, através da obtenção e avaliação dos vários descendentes obtidos de bodes de alto padrão genético. Esta técnica associada a IA facilita a difusão de genes dos melhores reprodutores e aumenta a descendência de machos selecionados, uma vez que um só ejaculado permite a criopreservação de 20 a 40 doses de sêmen (SIMÕES et al. 2008).

O sêmen caprino pode ser usado a fresco, resfriado ou congelado sendo que o sêmen congelado apresenta fertilidade menor quando comparado ao sêmen fresco e resfriado (SALAMON; MAXWELL, 2000). No entanto, pelo fato dos caprinos apresentarem estacionalidade reprodutiva, a utilização do sêmen em estado fresco ou resfriado fica limitado a determinados períodos do ano. Já o sêmen criopreservado, por ser mantido por um longo período armazenado em nitrogênio líquido, apresenta maior aplicabilidade (TRALDI, 2006).

O uso do sêmen congelado apresenta inúmeros benefícios, como o melhor aproveitamento de reprodutores, facilidade no transporte de material genético, introdução de novas linhagens no rebanho com maior segurança sanitária, preservação de genética diferenciada (SALAMON; MAXWELL, 1995; GOMES; et al. 2009). Mesmo a criopreservação possuindo diversas vantagens, o seu processo de congelamento e de

descongelamento pode induzir efeitos negativos aos espermatozoides, principalmente na sua estrutura bioquímica e funcionalidade (WATSON, 2000), resultando na redução da motilidade, integridade da membrana e capacidade de fertilização (PURDY, 2006). A composição plasmática do sêmen de ovinos e caprinos pode sofrer influência das estações do ano, se forem de raças oriundas de regiões com fotoperíodo bem definido, levando à redução da congelabilidade espermática fora da estação reprodutiva (AISEN, 2008).

Animais com fotoperíodo definido tendem a ter uma redução ou aumento no número de saltos e atividade espermatogênica em relação à estação do ano. As variações na atividade espermatogênica são influenciadas principalmente pelas mudanças do fotoperíodo, isto é, o aumento ou redução no comprimento do dia altera a produção de espermatozoides. O conhecimento do comportamento sexual, associado às variações na produção qualitativa do ejaculado no período pós-pubere, permite determinar a melhor época e idade de reprodução do macho caprino, possibilitando ao produtor a utilização racional de seus reprodutores (SANTOS et al., 2006). Tuli e Holtz (1995) avaliaram que no período reprodutivo a qualidade do sêmen pré e pós-criopreservação apresentou melhores resultados de motilidade e de espermatozoides vivos em comparação ao período não reprodutivo, isto se deve, segundo os próprios autores, a maior liberação de determinadas proteínas nas glândulas bulbouretrais no período não reprodutivo.

Durante o processo de criopreservação, os espermatozoides são expostos a vários fatores estressantes: transição de fase dos fosfolípidios da membrana, estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção dos crioprotetores, desidratação, aumento da concentração dos solutos e formação e dissolução de cristais de gelo (BORTOLOZZO et al., 2008). Desta forma, é imprescindível que o processamento de criopreservação ocorra de forma correta, evitando assim que estes fatores sejam os responsáveis por uma queda acentuada da qualidade do sêmen após a descongelamento.

A criopreservação empregando-se a geladeira (técnica convencional) é o método mais barato de congelamento seminal em comparação ao método automatizado, onde é utilizada uma máquina de criopreservação que torna o processo mais prático e rápido, porém é de alto custo podendo ser de difícil aquisição para a maioria dos pecuaristas. Na técnica da geladeira, o sêmen passa por avaliação macroscópica e microscópica em temperatura ambiente. Após as avaliações, é misturado o diluidor ao sêmen, sendo esta mistura denominada fração 'A', esta fração 'A' é levada à geladeira por 1 hora e 30 minutos previamente estabilizada a uma temperatura de 5°C. Após este tempo é inserida a fração 'B' na fração 'A', sendo que a fração 'B' é composta de diluidor e glicerol (12%) no volume total do diluidor. Com a mistura das soluções, o sêmen com diluidor e com glicerol é mantido por quatro horas na geladeira, após este período ocorre o envase que pode ser feito em palhetas de 0,5 mL ou de 0,25 mL. As palhetas são então expostas ao vapor de nitrogênio (-120°C) por aproximadamente 20 minutos e depois inseridas em nitrogênio líquido (BEZERRA, 2009).

2.3 Diluidores Usados na Criopreservação

As soluções utilizadas como diluidores do sêmen diferem em eficiência, em quantidade e na qualidade dos componentes. Porém, todos possuem a finalidade de preservação dos espermatozoides através da nutrição, proteção de sua membrana plasmática e equilíbrio osmótico do meio (DIAS, 2010).

Os diluidores são utilizados com o intuito de proteger os espermatozoides dos efeitos críticos da criopreservação. Um bom diluidor deve apresentar as seguintes características: ausência de toxicidade para a célula espermática; osmolaridade adequada (entre 425 e 525 mOsm); poder nutritivo; poder tampão eficaz para que o pH se estabilize em torno da

neutralidade (para caprinos, entre 6 e 8), ser de fácil preparo e de baixo custo (PURDY, 2006).

A principal função do diluente é a proteção dos espermatozoides de danos irreversíveis aumentando a sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea. Entretanto, os crioprotetores não garantem a sobrevivência de 100% das células espermáticas por causarem efeitos tóxicos sobre elas, dependendo da concentração utilizada no meio diluidor e do modo como é utilizado (FAHY, 1986; DIAS, 2010).

Segundo Bezerra (2010), na composição de um diluidor usado para a congelação do sêmen caprino é importante uma substância tampão como o tris ou EDTA, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotetores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido) e não penetrantes (leite ou gema de ovo) além de antibióticos, como por exemplo, a penicilina e a estreptomicina. O diluidor mais utilizado para criopreservação de sêmen caprino é o tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol (NEVES et al., 2008).

De acordo com a função, o crioprotetor pode interagir com a membrana celular, proporcionando sua estabilização, evitando lesões (MASSIP et al., 1986; DIAS, 2010). Outras substâncias podem atuar na diminuição da produção de cristais de gelo intracelular que são formados pela congelação da água livre intracelular, estes cristais podem perfurar a membrana da célula espermática promovendo a morte do espermatozoide.

Ainda existem aqueles que têm a função de diminuir o ‘efeito solução’ que ocorre com a exposição das células espermáticas não congeladas às altas concentrações de solutos durante a criopreservação. Deste modo, por osmose, os espermatozoides perdem água para o meio, reduzem o volume celular e correm o risco de romper as membranas plasmáticas (GRAHAM, 1996; AISEN, 2008).

Os valores de motilidade e vigor dos espermatozoides em relação ao tempo de exposição aos diluidores são alguns dos parâmetros que podem demonstrar a eficiência destas soluções. Desconsiderando as vias inerentes às fêmeas, pode-se esperar que as células com pouca movimentação e/ou, pouca velocidade e com alteração na membrana plasmática possuam baixa capacidade de encontrar e fecundar um oócito *in vivo*, características que podem ser melhoradas com o uso de um diluidor mais eficiente para determinada espécie (DIAS, 2010).

2.3.1 Crioprotetores não penetrantes (extracelulares)

Os crioprotetores classificados como não penetrantes são macromoléculas com ação crioprotetora que se dispõem entre a membrana plasmática e os fluidos hiperosmóticos durante a congelação (HOLT; HEAD; NORTH, 1992; SILVA, 2010), sendo sua crioproteção efetiva, mesmo quando são utilizadas elevadas velocidades de congelação, o que leva à promoção de uma rápida desidratação celular (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006). Os crioprotetores não penetrantes de maior utilização são a gema de ovo e o leite desnatado, embora outros agentes também possam ser utilizados com a mesma finalidade, como é o caso de alguns aminoácidos e açúcares (PURDY, 2006).

O leite é um líquido orgânico possuindo certa capacidade tampão, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia (CASTELO et al. 2008).

Sabe-se que duas substâncias responsáveis por esta característica são: a lactose, que age como elemento energético, e a caseína que é uma proteína capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides (CUNHA, 2002). Dorado et al. (2007) demonstraram

que amostras de sêmen caprino congeladas nesse diluidor resultavam em taxas de prenhez superiores àquelas obtidas com o tris-gema.

Bergeron et al. (2007) citado por Silva e Guerra (2011), concluíram que, as caseínas do leite reduzem a ligação das proteínas do plasma aos espermatozoides, minimizando a perda de lipídeos da membrana plasmática durante os procedimentos de criopreservação e aumentando a proteção espermática durante a refrigeração e a congelação/descongelação. Possui um efeito protetor do leite sobre a célula espermática envolvendo proteínas ao invés de lipídeos como ocorre com diluidores com gema de ovo.

O princípio de atuação dos açúcares não penetrantes se baseia no aumento da pressão osmótica e posterior desidratação celular, com redução da formação de gelo intracelular, sendo comumente utilizados nos meios de congelação de espermatozoides e oócitos por minimizarem o estresse osmótico, causado durante a etapa de refrigeração (SQUIRES et al. 2004). Além disso, os açúcares podem interagir com os fosfolipídios da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (PURDY, 2006).

Purdy (2006) ressaltou que a escolha do açúcar incluído no crioprotetor deve ser baseada na sua funcionalidade e nas propriedades químicas. Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose, e os açúcares não penetrantes na célula, como lactose, rafinose e trealose (SQUIRES et al. 2004).

A gema de ovo é um dos constituintes mais utilizados como base dos diluidores de sêmen dos animais domésticos. Ela protege o espermatozoide contra o choque térmico, devido à presença das frações lipoproteicas de baixa densidade (LDL) na sua composição, preservando o espermatozoide. Os fosfolipídios presentes na gema de ovo interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides, levando à proteção das células que estão em processo de resfriamento, permitindo a estabilização destas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico (HOLT, 2000; BISPO, 2009).

A prevenção conferida pelos lipídeos com relação ao choque térmico parece estar relacionada à quelação do íon Ca^{+2} do meio, evitando sua entrada no espermatozoide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelação que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (WILHELM et al. 1996).

Valente et al. (2010) avaliaram a substituição parcial ou total da gema de ovo no diluidor de sêmen ovino e observaram que a adição de trealose e glicina, associada à substituição da glicose pela frutose, não foi capaz de compensar a ausência da gema de ovo. Estes autores avaliaram que os melhores resultados de motilidade, termorresistência, fertilidade *in vitro* e *in vivo* pós-descongelação foram obtidos após utilização da gema de ovo no meio diluidor.

Bispo (2009) avaliou diferentes porcentagens de gema de ovo (20% e 2,5%) no diluidor citrato-gema e constatou que o diluidor com baixa concentração de gema (2,5%) proporcionou melhores resultados em relação ao diluidor com alta concentração (20%) referentes ao sêmen caprino resfriado.

Iritani e Nischikawa (1961; citados por BISPO, 2005) identificaram a enzima fosfolipase A, que catalisa a hidrólise das lecitinas da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitinas. Como provável solução desse problema, Ritar e Salamon (1982; BISPO, 2009) utilizaram no diluidor 1,5% de gema de ovo na sua concentração final. Evans e Maxwell (1987; BISPO, 2009) recomendaram 2,5% no total do volume do diluente. Bispo (2005) avaliou, *in vitro*, o sêmen caprino diluído em Citrato-gema em duas concentrações de gema (2,5 e 20%) e resfriado a 5°C durante 48 horas. Sendo que o diluidor contendo baixa concentração de gema (2,5%) foi o que melhor preservou o sêmen durante as 48 horas de armazenamento.

Palomino et al. (2001) afirmaram que os melhores resultados apresentados após o resfriamento de sêmen caprino em diluidor citrato acrescido de 3% a 12% de gema ocorreu em função da presença de fosfolípidios, lecitinas, lipoproteínas e cefalinas que promovem uma reorganização da membrana plasmática do espermatozoide, reduzindo assim os efeitos deletérios causados pelo frio.

Farstad (2009) verificou que a utilização da gema de ovo na preparação de crioprotetores pode ser questionada quanto à sua origem, pois ser veículo de possíveis micro-organismos. Componentes que podem substituir este crioprotetor vêm sendo testados, como lecitinas de soja, onde possuem meios quimicamente definidos, o que não seria possível com o uso da gema de ovo, imprecisa quanto a sua composição (HIWASA et al., 2009). Porém, Bittencourt et al. (2008) avaliaram na criopreservação de sêmen caprino que o diluente contendo lecitina de soja apresentaram resultados abaixo do esperado para aprovação do sêmen congelado.

Apesar dos benefícios que foram evidenciados com a utilização da gema de ovo em diluidores de sêmen, alguns autores sugerem o seu uso diferenciado quando o sêmen é proveniente da espécie caprina. Roy (1957) afirmou que diluidores que contenham gema de ovo em sua composição não são recomendados para a utilização em sêmen caprino.

2.3.2 Crioprotetores penetrantes (intracelulares)

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a congelação causa na célula espermática (KAROW, 2001; GONZALES, 2004). As características físico-químicas ideais que um crioprotetor penetrante deve possuir são: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e uma baixa toxicidade celular (NASH, 1966; GONZALES, 2004).

A habilidade de um crioprotetor de se ligar ao hidrogênio da molécula de água é a mais importante característica de um bom crioprotetor (NASH, 1966; GONZALES, 2004). A toxicidade de um crioprotetor é influenciada por sua concentração, momento de adição e temperatura em que é realizada a exposição da célula ao agente.

Os crioprotetores penetrantes foram classificados por Ashwood-Smith (1987) em dois grupos, os dos alcoóis e o das amidas. Os crioprotetores alcoóis são principalmente o glicerol, o etilenoglicol (FICKEL et al. 2007) e o metanol. Os crioprotetores amidas são a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilformamida (SILVA et al. 2006) e a dimetilacetamida (CALDERAM et al., 2008).

Muitos crioprotetores permeáveis à membrana, como por exemplo, o glicerol, o etilenoglicol e o propilenoglicol, foram testados na criopreservação de sêmen caprino. Porém o mais utilizado é o glicerol (BISPO, 2009).

O glicerol atua sobre a membrana permitindo a sua estabilização, evitando danos sobre a estrutura, que são gerados pela exposição da célula a elevadas concentrações de sais durante a congelação (HOLT et al., 1992). O seu efeito crioprotetor se relaciona à sua capacidade de ligação com a água e à baixa dissociação com sais, portanto, reduzindo a osmolaridade do meio de criopreservação. Isto ocorre por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa. Modifica a formação de cristais de gelo, de modo que a lesão das células espermáticas durante a cristalização é reduzida, uma vez que este agente penetra na célula e substitui parcialmente seu conteúdo de água e eletrólitos (SINGH, 2006).

O glicerol, um crioprotetor celular, é largamente utilizado para a congelação de sêmen caprino, cuja concentração usada em diferentes estudos varia de 3% a 9%, com melhores resultados entre 4% a 7% do diluente utilizado (LEBOEUF et al. 2000). Em estudo comparativo entre o glicerol e etilenoglicol na criopreservação do espermatozoide caprino,

Souza et al. (2002) observaram que o grupo que continha o glicerol a 7% foi mais eficaz em preservar a motilidade pós-descongelação do que o grupo com etilenoglicol a 7%, embora não houvesse diferença entre os grupos, em relação às alterações morfológicas.

Soares (2002) avaliou, em sêmen canino, a capacidade crioprotetora do etilenoglicol em diluente tris gema na manutenção da motilidade, do vigor e da morfologia espermática concluindo que, em determinadas concentrações o etilenoglicol pode substituir o glicerol em diluentes à base de tris gema.

Ainda sobre o glicerol, os seus efeitos tóxicos sobre os espermatozoides são apresentados por Hammerstedt e Grahan (1992) que descrevem uma provável interação molecular do glicerol com a membrana plasmática dos espermatozoides, alterando sua fluidez pela inserção na dupla camada lipídica, o que modifica a viscosidade citoplasmática e, dessa forma, afeta todas as reações metabólicas.

2.4 Efeito do Plasma Seminal

O sêmen caprino apresenta particularidades que o diferenciam de outras espécies, sendo a mais importante a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbo uretrais liberadas no plasma seminal (BEZERRA, 2010). O plasma seminal contém diversos componentes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos dentro do mecanismo de regulação da função do espermatozoide. Porém, as exatas funções desses componentes seminais no controle da motilidade espermática ainda não estão bem elucidadas (CATUNDA et al., 2009).

O plasma seminal auxilia na manutenção da motilidade, na sobrevivência e no transporte espermático no sistema reprodutor do macho e da fêmea (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Contudo, estudos sobre as proteínas do plasma seminal ainda precisam definir os tipos de proteínas e os mecanismos de ação que afetam a viabilidade desses gametas (ASADPOUR et al., 2007).

A criopreservação proporciona mudanças na organização lipídica da membrana, com modificação nas proteínas cinéticas das enzimas intramembranas. A resposta do sinal de transdução pode ser afetada por estas mudanças, auxiliando com a possibilidade de que a longevidade do sêmen descongelado seja reduzida em virtude da precoce capacitação espermática (HOLT e NORTH, 1984, 1986; DROBNIS et al., 1993; GUERRA et al., 2009).

Determinadas proteínas do plasma seminal aderem-se aos espermatozoides no trânsito epididimário ou durante a ejaculação, podendo retardar a capacitação e, conseqüentemente, a reação acrossômica (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Segundo Souza et al. (2009), essas proteínas são denominadas de decapacitantes e são removidas ou modificadas pelos fluidos do sistema reprodutor feminino durante a capacitação espermática e a fecundação. As caltrinas, um tipo de proteínas decapacitantes, são proteínas do plasma seminal que possuem baixa massa molecular (5 a 10 kDa) e previnem o aumento da concentração de Ca^{2+} nos espermatozoides, evitando a capacitação espermática precoce provocada pelo processo de criopreservação (FLESCHE; GADELLA, 2000).

Alguns estudos demonstram que ocorrem diferenças entre as membranas espermáticas dos espermatozoides do epidídimo e do ejaculado, de acordo com a influência do plasma seminal (HENAULT et al., 1995; CATUNDA et al., 2009). Estes estudos sugerem que alguns componentes presentes nas secreções das glândulas anexas podem aumentar ou inibir a fertilidade de touros (HENAULT et al., 1995; CATUNDA et al., 2009). Uma das razões desse impasse está na diversidade do plasma entre as espécies e entre animais da mesma espécie, ocorrência e concentração de muitos constituintes seminais importantes (RODGER, 1975; CATUNDA et al., 2009).

De acordo com Viana et al. (2006), a remoção do plasma seminal por centrifugação, imediatamente após a colheita, aumenta a porcentagem de células vivas durante a armazenagem em diluidores contendo gema de ovo ou leite. Em pesquisas sobre a atividade das enzimas fosfolipase e lisofosfolipase sobre as lecitinas contidas na gema de ovo utilizada no diluente à base de tris, estes autores concluíram que não há hidrólise desses fosfolipídios. Observaram ainda que a congelação do sêmen em diluidor tris-gema de ovo, sem a remoção do plasma seminal, produz altas taxas de fertilidade.

Segundo Purdy (2006), o método convencional de superar as interações prejudiciais do plasma seminal com as proteínas da gema do ovo, é diluir a amostra de sêmen caprino em diluidor tamponado e, então separar o plasma seminal dos espermatozoides pela centrifugação.

Azerêdo et al. (2001) avaliaram a ausência ou presença do plasma seminal no sêmen fresco e após a congelação. As amostras que não foram submetidas à retirada do plasma seminal foram mais bem conservadas, tanto a fresco, como após o descongelamento. Estes autores concluíram que a remoção do plasma seminal foi prejudicial para a congelação de sêmen caprino, uma vez que o percentual de espermatozoides com membranas plasmáticas íntegras e de motilidade espermática diminuíram após a centrifugação do plasma seminal.

O plasma seminal possui substâncias que atuam como antioxidantes proporcionando proteção celular durante os procedimentos de manipulação espermática e redução da temperatura, com o intuito de reduzir as crioinjúrias ocasionadas pelo estresse oxidativo (Guerra et al., 2004). Reduzidas concentrações de espécies reativas ao oxigênio (ROS) são necessárias para que o espermatozoide adquira a capacidade fecundante (BAUBER et al., 2003; SOARES; GUERRA, 2009). Com a remoção do plasma o espermatozoide fica suscetível à atividade das ROS que em elevadas concentrações podem afetar o metabolismo energético, a motilidade, a viabilidade e a integridade do DNA espermático (BILODEAU et al., 2002; SOARES; GUERRA, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento e Período

Este experimento foi realizado na área de Reprodução Animal pertencente ao Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica/RJ, no período de fevereiro a julho de 2012. O município situa-se a 22°45'53''S, 43°41'56''W e 33m de altitude acima do nível do mar.

3.2 Animais e Manejo

Foram utilizados quatro bodes jovens da raça Saanen, com idade variando entre 10 meses e 1 ano, pesando em média 20Kg, mantidos em baias individuais, alimentados com forragem, concentrado no cocho duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foi realizado o controle de endoparasitas com Ripercol® L Solução (Cloridrato de Levamisol à 5%) (Fort Dodge) de quinze em quinze dias até a obtenção do controle parasitário.

3.3 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi o inteiramente casualizado com fatorial 4x2x2 (quatro animais x duas concentrações de gema x presença ou não do plasma seminal).

3.4 Coleta de Sêmen

Foram realizadas duas coletas semanais de sêmen durante um mês para cada um dos animais, pelo método da vagina artificial no período de condicionamento. Este sêmen coletado foi utilizado para a avaliação das características seminais (volume, turbilhonamento, motilidade, vigor) e descartado posteriormente. Para o congelamento, o sêmen foi coletado entre os meses de junho e julho sendo feitas duas coletas por semana no período de três semanas. Antes da coleta foi feita a higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro e higienização interna com solução fisiológica a 0,9% aquecida, diminuindo possíveis contaminações do sêmen. As coletas de sêmen dos bodes ocorreram nos mesmos dias, evitando variações entre os ejaculados decorrentes do clima, da alimentação e do manejo. Foram realizadas seis coletas (repetições) para cada animal.

Em cada dia do experimento, foi feita a coleta de sêmen de três dos quatro bodes usados no projeto, sendo que em cada dia foi feito o revezamento dos animais conforme Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de revezamento na coleta de sêmen dos bodes.

RODADA 1	RODADA 2	RODADA 3	RODADA 4	RODADA 5	RODADA 6
BODE 1	BODE 4	BODE 1	BODE 1	BODE 1	BODE 4
BODE 2	BODE 2	BODE 4	BODE 2	BODE 2	BODE 2
BODE 3	BODE 3	BODE 3	BODE 4	BODE 3	BODE 3

3.5 Análise do Sêmen

Imediatamente após a coleta de sêmen de cada reprodutor, com um intervalo médio de 10 minutos entre cada coleta, o sêmen de cada reprodutor foi levado ao laboratório e mantido em banho-maria a 37°C sendo o volume (mL) determinado no próprio tubo graduado de coleta. As avaliações de turbilhonamento, da motilidade, do vigor e da concentração espermática foram realizadas com o auxílio de um microscópio óptico. O turbilhonamento foi avaliado pela deposição de uma gota de sêmen puro (20µL) sobre a lâmina aquecida a 37°C e avaliado em microscópio óptico com objetiva de 4x, recebendo posteriormente uma nota que varia de 0 a 5. A motilidade (0 a 100%) e o vigor (0 a 5) foram determinados pela deposição de uma gota de sêmen diluído no diluidor citrato-gema aquecido no banho-maria a 37°C entre lâmina e lamínula também aquecidas a 37°C e avaliados no microscópio com objetiva de 40x.

Após a análise do sêmen de cada animal, foi feito um “pool” dos ejaculados, onde foi reavaliada a motilidade, o vigor e feita a concentração espermática. Para determinação da concentração, foi feita a deposição de uma gota de sêmen diluído em água na proporção de 1:100 (10µL de sêmen em 90µL de água) na câmara de Neubauer onde ocorreu a contagem das células espermáticas. Após determinada a concentração espermática do “pool”, foi feito o cálculo do número de doses de sêmen considerando a concentração da dose inseminante de 40 milhões/dose.

3.6 Centrifugação e Diluição

Após as análises seminais, o “pool” formado com o sêmen de cada animal foi dividido em quatro amostras contendo 0,250mL cada. Duas amostras de sêmen puro foram centrifugadas por 15 minutos a uma rotação de 800g para a separação do plasma seminal, onde o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em diluidor.

O diluidor utilizado foi o citrato gema (1,47g de Citrato de Sódio; 0,03g Penicilina; 50mL água destilada), onde foi dividido em duas alíquotas iguais, em uma das amostras foi adicionado 5% de gema (2,5mL gema : 47,5mL solução de citrato com penicilina) e na outra foi adicionado 10% de gema (5,0mL gema : 45,0mL solução de citrato com penicilina).

Cada amostra de sêmen (com e sem plasma) foi dividida em dois volumes iguais, onde foi inserido o diluidor com as diferentes porcentagens de gema como mostrado no esquema a seguir:

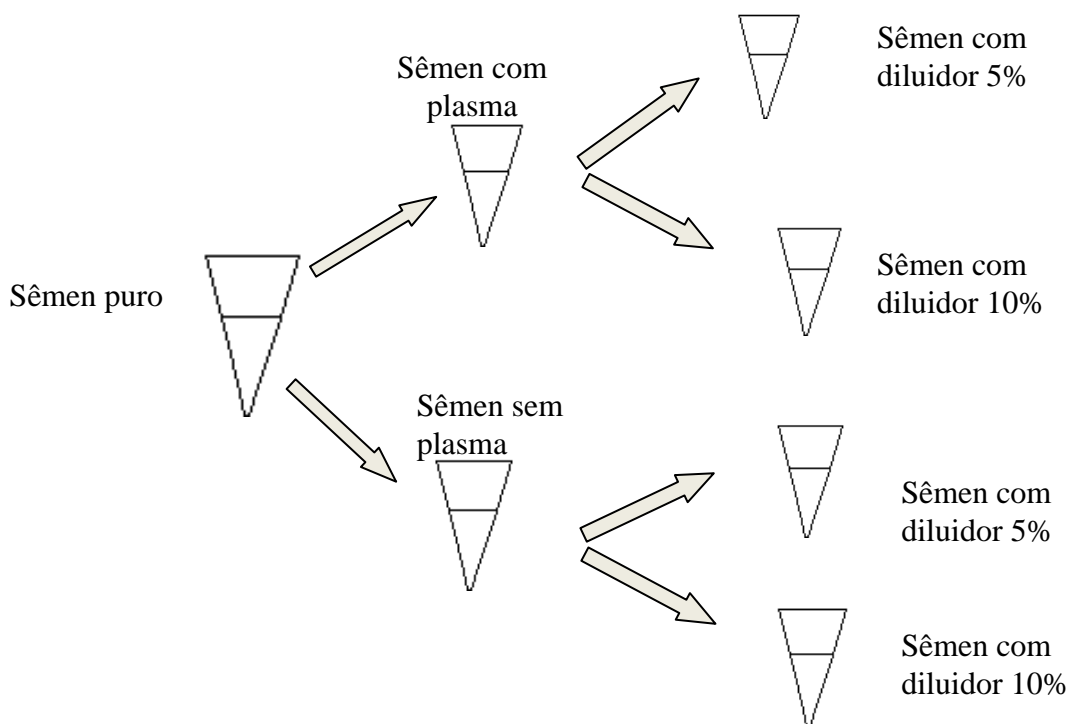


Figura 1. Divisão do sêmen dos bodes Saanem (“pool”) com e sem plasma seminal e adição do diluidor com diferentes porcentagens de gema.

3.7 Criopreservação Seminal

Após a realização da diluição, o sêmen foi criopreservado pelo método convencional (geladeira). Este método consiste na utilização de duas frações (fração ‘A’ e fração ‘B’). A fração ‘A’ é composta de diluidor e sêmen, esta contendo as diferentes concentrações de gema, sendo preparada em temperatura ambiente e depois colocada na geladeira a 5°C. A fração ‘B’ é composta do mesmo diluidor utilizado na fração ‘A’ e 12% de glicerol sendo também colocada em geladeira. Depois de 1 hora e 30 minutos na geladeira a 5°C (tempo de equilíbrio), a fração ‘B’ foi adicionada à fração ‘A’ em três parcelas iguais com intervalos de cinco minutos cada para evitar o choque osmótico do sêmen com diluidor contendo glicerol. Após o período de quatro horas na geladeira (período de glicerolização), foi feito o envase com a fração contendo as duas misturas (fração ‘A’+ fração ‘B’). O envase foi feito em

palhetas de 0,5mL identificadas e vedadas com álcool polivinílico na geladeira, com o auxílio de uma seringa utilizada para inserir o diluidor nas palhetas. Estas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido a uma temperatura de aproximadamente -120°C por 20 minutos. Passado este período, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijão de criopreservação. Em cada partida foram congeladas cinco palhetas para cada ejaculado (com e sem plasma) e para cada porcentagem de gema totalizando 360 amostras no final do experimento.

3.8 Descongelamento do Sêmen e Testes de Termo Resistência Rápido e Lento.

Após um período mínimo de 48 horas da criopreservação do sêmen, três palhetas de cada repetição e de cada animal foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos para avaliação da motilidade e vigor pós-descongelamento. Após a descongelamento, as amostras foram submetidas aos testes de termo resistência rápido (TTRR) e lento (TTRL). No TTRR o conteúdo da palheta, após a descongelamento, permaneceu 30 minutos em banho maria a uma temperatura de 46°C . No TTRL os espermatozoides permaneceram até duas horas a uma temperatura de 37°C .

3.9 Análise Estatística

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste F, com $p < 0.05$. As análises foram realizadas pelo programa SAS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sêmen Fresco

Foram feitas avaliações do volume, da motilidade, do vigor do sêmen fresco de cada animal e estas avaliações foram repetidas para o “pool” formado, sendo que a concentração espermática foi avaliada apenas no “pool” dos ejaculados. Os valores médios de volume, motilidade e vigor espermático dos reprodutores foram 0.57mL , $79.8\% \pm 5.1$ e 3.6 ± 0.62 , respectivamente. Estes valores assemelham-se ao encontrado por Bispo (2005), que foram de $82,33\% \pm 9,79$ e $3,93 \pm 0,41$. Os valores encontrados estão de acordo com os padrões preconizados para o sêmen caprino recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Os valores respectivos para estas análises estão apresentados nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2. Valores de média e desvio-padrão do volume, motilidade e vigor do sêmen fresco de cada bode da raça Saanem utilizado no experimento.

BODES	VOLUME (mL)	MOTILIDADE (%)	VIGOR (0-5)
1	0.7 ± 0.08^a	83.7 ± 4.8^a	4.1 ± 0.6^a
2	0.6 ± 0.0^a	80.0 ± 0.0^b	3.5 ± 0.7^b
3	0.7 ± 0.2^a	78.3 ± 7.5^b	3.4 ± 0.7^b
4	0.3 ± 0.2^b	77.5 ± 8.2^b	3.4 ± 0.5^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Os valores obtidos neste experimento para motilidade e vigor estão acima do valor mínimo exigido para o sêmen caprino fresco sugerido pelo CBRA (1998), sendo

respectivamente 70% e 3,0. Houve diferença estatística significativa para motilidade e vigor do bode 1 em relação aos outros animais. Esta diferença pode ser dada por particularidades do próprio animal, pois a diferença de idade deste para os outros bodes é de dois meses tendo assim o sistema reprodutor um pouco mais desenvolvido que os demais, sendo o manejo de todos os animais do experimento exatamente o mesmo.

Tabela 3. Valores de motilidade (%) e concentração espermática (sptz/mL) do “pool” dos ejaculados dos bodes jovens Saanem.

	DIAS DE COLETA					
	1	2	3	4	5	6
MOTILIDADE (%)	70	70	70	85	80	80
CONCENTRAÇÃO (sptz/mL)	3.620×10^6	2.740×10^6	3.060×10^6	3.250×10^6	4.910×10^6	4.070×10^6

O valor médio da concentração espermática obtido em caprinos está em torno de $3,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL, podendo variar entre $1,0$ e $5,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL (CASTELO et al., 2008). Observando os dados obtidos, avalia-se que esses dados estão dentro do padrão da espécie.

4.2 Sêmen Congelado

A tabela 4 apresenta o resultado da análise de variância observado quando comparou-se os resultados dentro de cada tratamento (porcentagem de gema e presença ou não do plasma seminal).

Tabela 4. Resumo da análise de variância para motilidade e vigor após descongelamento (MPD e VPD), após TTR rápido (MTTRR e VTTRR), após TTR lento de 1h (MTTRL1 e VTTRL1) e após TTR lento de 2h (MTTRL2 e VTTRL2).

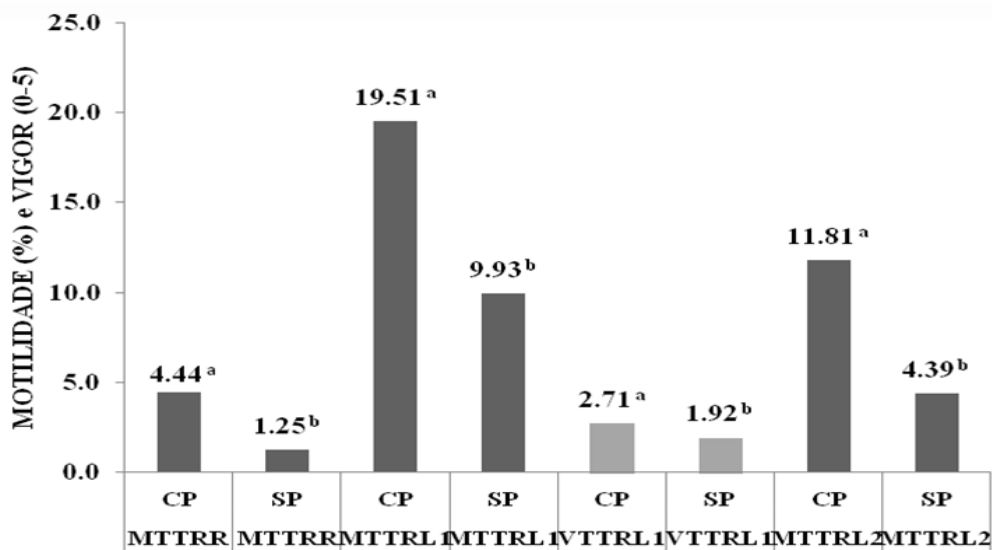
Caract.	Fonte de Variação						
	Plasma	Gema	Plasma*Gema	Gema/CP	Gema/SP	Plasma/GE 10%	Plasma/GE 5%
g.l.	1	1	1	1	1	1	1
MPD	**	NS	**	*	**	**	NS
VPD	**	*	*	NS	**	**	NS
MTTRR	**	**	NS	-	-	-	-
VTTRR	**	**	*	**	NS	**	*
MTTRL1	**	*	NS	-	-	-	-
VTTRL1	**	NS	NS	-	-	-	-
MTTRL2	**	*	NS	-	-	-	-
VTTRL2	**	NS	*	NS	NS	**	NS

*P<0,05 **P<0,01 pelo teste F, NS = não significativo.
CP= com plasma; SP= sem plasma; GE= gema

Houve diferença em relação aos valores de Motilidade após TTR Rápido (MTTRR), Motilidade após TTR Lento 1 Hora (MTTRL1), Vigor após TTR Lento 1 hora (VTTRL1) e Motilidade após TTR Lento 2 horas (MTTRL2), em relação ao sêmen com plasma e sem plasma seminal (figura 2). Estes resultados demonstram que o sêmen com plasma seminal promoveu uma melhor qualidade do sêmen caprino independente da quantidade de gema no diluidor citrato-gema, estando de acordo com Azerédo, Esper, Resende (2001); Gil et al. (2002) e Viana et al. (2006), que relatam efeitos deletérios aos espermatozoides após centrifugação para separação do plasma e posterior adição do diluidor contendo gema. Assim, os resultados obtidos neste estudo não estão de acordo com aqueles observados por Memon, Bretzlaff, Ott, (1985); Ritar e Salamon (1982) e Sariozkan et al. (2010) que descobriram efeitos benéficos da centrifugação e da remoção do plasma na qualidade do sêmen caprino.

Os resultados positivos neste experimento para o sêmen com o plasma podem ser explicados pelo experimento ter ocorrido na estação reprodutiva, onde os níveis de fosfolipase A se encontram em menor quantidade no plasma seminal em comparação ao sêmen coletado fora da estação reprodutiva. Segundo Nunes (1982); Brito (2008), durante a estação não reprodutiva, as glândulas bulbouretrais hipertrofiam e aumentam sua atividade, pelas altas concentrações plasmáticas de prolactina e produzem mais fosfolipase A.

A idade dos reprodutores também pode ter influenciado os resultados neste estudo, onde foram utilizados animais jovens (10 meses a 1 ano). Animais jovens ainda se encontram no processo de desenvolvimento do sistema reprodutor, com isso pode haver uma menor produção da fosfolipase A em comparação a animais adultos, onde as glândulas bulbouretrais já se encontram bem desenvolvidas.



CP= com plasma
 SP= sem plasma
 MTTRR= Motilidade após Teste de Termoresistência Rápido
 MTRRL= Motilidade após Teste de Termoresistência Lento
 VTTRL= Vigor após Teste de Termoresistência Lento

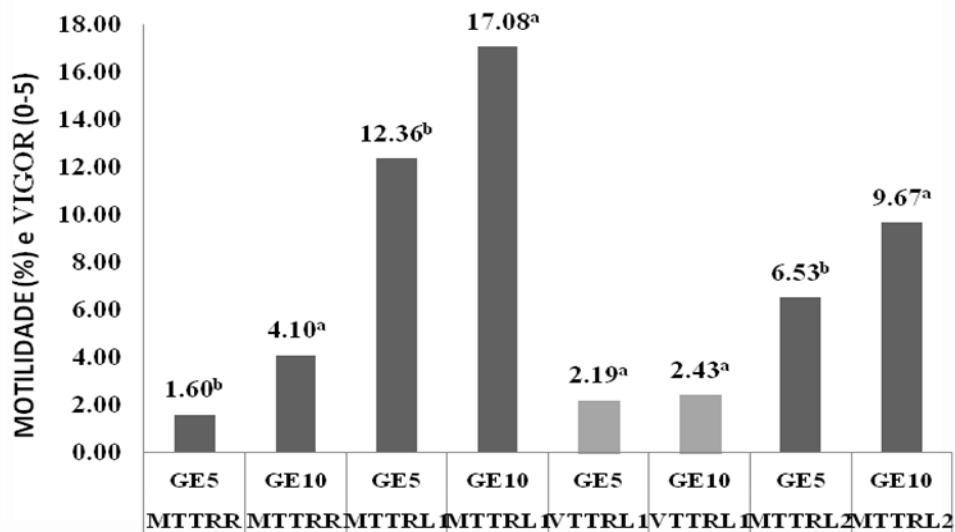
Figura 2. Valores do efeito do plasma seminal em “pool” criopreservado do sêmen dos quatro reprodutores Saanem sobre as características MTTRR, MTTRL1 hora, VTTRL1 hora, MTTRL 2horas.

Houve diferença em relação aos valores de Motilidade após TTR Rápido (MTTRR), Motilidade após TTR Lento 1 Hora (MTTRL1), e Motilidade após TTR Lento 2 horas (MTTRL2), em relação ao sêmen com o diluidor citrato contendo 5% e 10% de gema (figura 3). Estes resultados demonstram que o diluidor contendo 10% de gema promoveu melhores resultados nas análises, independente da presença do plasma seminal. Para o vigor pós TTR lento 1 hora, não foi verificada diferença entre as porcentagens de gema.

Segundo Ferrari e Barnabe (1999), as amostras de sêmen congeladas em diluidor à base de tris com 2,6% de gema apresentaram melhor resultado de motilidade retilínea e progressiva (31,6%) após o teste de termorresistência em comparação ao diluidor à base de leite desnatado, o que não foi confirmado neste experimento, onde o diluidor que possui maior valor de gema (10%) promoveu melhores resultados no TTR Rápido e Lento (1h e 2h). Esta diferença pode ter ocorrido pelo diluidor utilizado no experimento destes autores (diluidor tris) ser diferente do utilizado neste experimento (diluidor citrato), sendo que o diluidor citrato com 10% de gema pode proporcionar maior proteção ao espermatozoide na criopreservação por elevar a pressão osmótica, resultando na desidratação celular, com consequente redução da formação de gelo intracelular. Memon et al. (1985) reportaram diminuição na sobrevivência de espermatozoides criopreservados em diluidor contendo 11% de gema de ovo. No Teste de Termoresistência Lento (1 h/ 120 minutos), o período de incubação afetou a morfologia espermática, aumentando as porcentagens de alterações de cabeça e alterações de cauda nos espermatozoides diluídos e congelados em ACP-101(água de coco em pó). Após o período de 120 minutos, a porcentagem de espermatozoides normais foi influenciada significativamente pelo diluente, tendo o meio diluente à base de TRIS (20% de gema) apresentado resultados superior (TRIS-56,73±6,66; ACP-101-47,60±7,70) (OLIVEIRA et al., 2009).

Daskın e Tekin (1996) avaliaram que o sêmen caprino descongelado obteve motilidade maior em um diluidor com 20% de gema de ovo em relação ao diluidor sem a gema durante a época reprodutiva. A gema de ovo é um crioprotetor externo que visa uma proteção relacionada aos danos oriundos do processo de resfriamento (EVANS; MAXWELL, 1990; PURDY, 2006; citados por OLIVEIRA et al.2009) como também pela etapa de congelamento (ABOAGLA; TERADA, 2004).

Em comparação ao diluidor com diferentes porcentagens de gema, observa-se que uma maior quantidade de gema no meio à base de citrato pode ter gerado sua maior proteção na criopreservação pela presença de fosfolipídios, que agem na superfície celular, restaurando a perda de fosfolipídios que ocorre durante o choque térmico e prevenindo, consequentemente, a ruptura da membrana celular (BISPO, 2005).



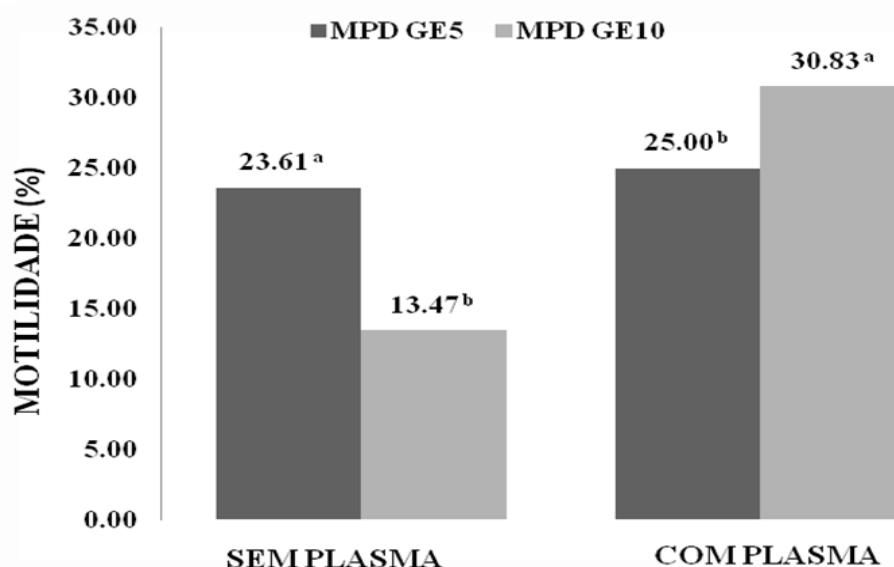
GE=gema
 MTTRR= Motilidade após Teste de Termoresistência Rápido
 MTRRL= Motilidade após Teste de Termoresistência Lento
 VTTRL= Vigor após Teste de Termoresistência Lento

Figura 3. Valores do efeito de porcentagem de gema em pool do sêmen dos quatro reprodutores jovens no diluidor citrato-gema com 10% e 5% de gema sobre as características MTTRR, MTRRL 1 hora, VTTRL 1 hora, MTTRL 2 horas.

Com relação aos valores de motilidade pós-descongelamento (MPD) mostrados na figura 4, ocorreu diferença em relação ao sêmen com e sem plasma no diluidor citrato-gema contendo 5% e 10% de gema. O diluidor contendo 10% de gema promoveu melhores resultados na presença do sêmen com o plasma seminal em relação às amostras centrifugadas. Porém no sêmen sem o plasma, o diluidor com 5% de gema promoveu melhor valor de motilidade em comparação ao sêmen com 10% de gema no diluidor. O melhor resultado de motilidade pós-descongelamento pode ter ocorrido pelo plasma seminal junto com a maior concentração de ovo promover proteção ao espermatozoide no processo de criopreservação, estabilizando a membrana, reduzindo o rompimento desta no congelamento. Pode reduzir também a atividade das espécies reativas de oxigênio (ROS) que em altas concentrações podem inibir a respiração enzimática, diminuir a motilidade e causar danos no DNA espermático.

Os valores obtidos neste experimento para motilidade pós-descongelamento são inferiores aos resultados obtidos por Siqueira et al. (2009). Estes autores utilizaram diluidor com baixa concentração de gema de ovo no sêmen resfriado por 24 horas e obtiveram motilidade de 62,50%, porém, é observado que a motilidade avaliada no experimento destes autores é relacionada ao sêmen resfriado sendo o método diferenciado do experimento em questão, o que causa menos danos no espermatozoide em relação ao sêmen congelado. O mesmo ocorreu com Siqueira (2006), onde utilizando sêmen não lavado e diluidor tris com 2,5% de gema, observou valores de 62,5% para motilidade no sêmen resfriado. Com o processo de criopreservação, os espermatozoides sofrem crioinjúrias o que pode causar redução da motilidade espermática pós-descongelamento.

No trabalho de Cardoso et al. (2000), foi avaliado que o valor de motilidade caiu para 50,0% em diluidor à base de água de coco acrescido de 20% de gema sendo eficiente na manutenção da qualidade do sêmen canino criopreservado em comparação ao diluidor contendo apenas água de coco onde possuiu motilidade pós descongelamento de 2,0%. Cardoso et al. (2010) avaliou no sêmen canino resfriado a 4°C valor de motilidade superior (22,50%) no diluidor ACP-106® contendo 20% de gema em comparação ao sêmen diluído no diluidor contendo 5% de gema (10,50%).



GE=gema
MPD= Motilidade Pós-Descongelamento

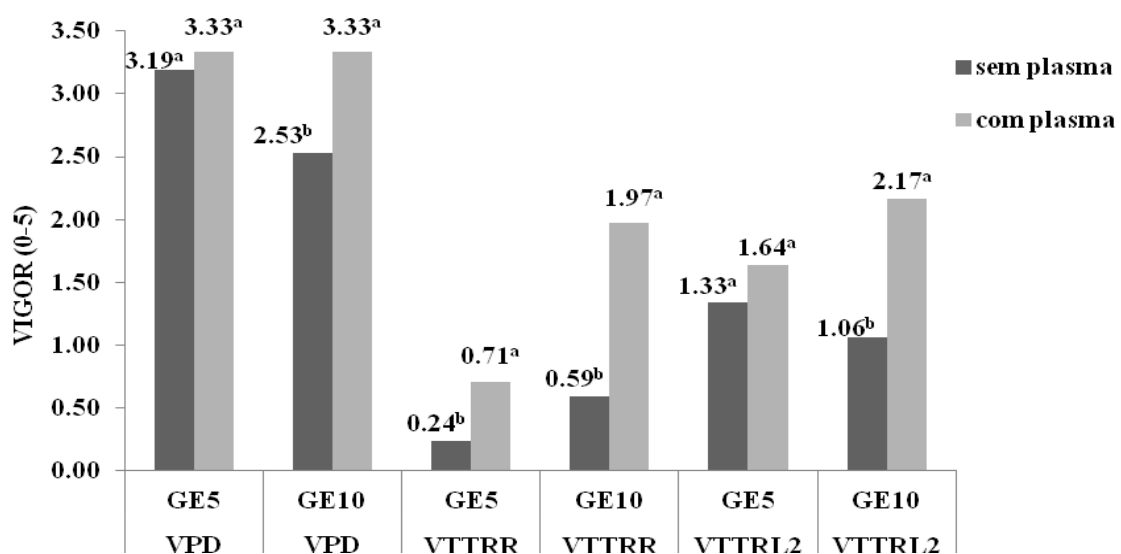
Figura 4. Valores para motilidade (%) pós-descongelamento no sêmen com e sem plasma e nas duas porcentagens de gema (5% e 10%) dos quatro reprodutores Saanen.

Nas análises mostradas na figura 5 em relação ao vigor pós-descongelamento (VPD), vigor após TTR Rápido e vigor após TTR Lento 2 horas não ocorreu diferença entre o sêmen com e sem plasma no diluidor contendo 5% de gema. Porém ocorreu diferença destas análises em relação ao sêmen com e sem plasma no diluidor com 10% de gema e em relação às porcentagens de gema, onde o diluidor contendo 10% de gema proporcionou melhores resultados em comparação ao diluidor contendo 5% de gema. A hipótese proposta é que a maior concentração de gema proporcionou junto com o plasma seminal maior proteção à célula espermática na criopreservação, o que vai contra alguns autores (USTUNER et al. 2009), que avaliaram que o sêmen contido no diluidor tris contendo 18% de gema no sêmen com plasma proporcionou resultados inferiores de motilidade (16.7%) ao encontrado neste mesmo trabalho utilizando diluidor tris contendo 6% (35.7%) e 12% (47.7%) de gema.

Dias (2010), avaliando diferentes diluidores na criopreservação de sêmen caprino sem centrifugação descongelado, verificou que o diluidor tris contendo menor concentração de gema em relação a este trabalho (2,5%), promoveu melhores resultados de vigor pós TTR Lento (37°C/1 h) (1.0 ± 0.2) em comparação aos diluidores testados: ringer lactato (0.2 ± 0.1) e citrato de sódio 2,92% (0.1 ± 0.1), porém, estes resultados divergem do presente estudo onde os valores de TTR Lento (2h) se mostram superiores (1.64 com gema 5% e 2.17 com gema 10%) ao encontrado pelo autor. Nunes et al. (1982) observaram aspectos positivos da

presença do plasma seminal na sobrevivência de espermatozoides submetidos à congelamento, sendo apoiado por Azeredo et al. (2001), ao constatarem que a remoção do plasma seminal reduziu a motilidade e o vigor espermáticos de amostras congeladas de sêmen caprino. Segundo Corteel et al. (1980), mesmo com o efeito favorável ou não da centrifugação no ejaculado, existem diferenças entre as colheitas de sêmen durante as estações, uma vez que as células suportam melhor o processo de criopreservação durante a estação reprodutiva, como no caso deste experimento onde as coletas foram realizadas no final do período reprodutivo (entre os meses de junho e julho).

A remoção do plasma seminal pode ser deletéria para o espermatozoide por reduzir a presença de substâncias antioxidantes no plasma. A falta destas substâncias pode favorecer a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam redução da motilidade, da viabilidade e da integridade do DNA espermático. Com o plasma mantido no sêmen, este reduziu os efeitos deletérios das ROS, preservando as características seminais junto com a maior concentração de gema no diluidor.



GE=gema
 VPD=Vigor Pós-Descongelamento
 VTTRR= Vigor após Teste de Termoresistência Rápido
 VTTRI.2= Vigor após Teste de Termoresistência Lento

Figura 5. Valores de vigor pós-descongelamento, vigor pós TTR Rápido, vigor pós TTR lento 2 horas do sêmen com e sem plasma e nas duas porcentagens de gema (5% e 10%) para o sêmen dos reprodutores Saanem.

Apesar da diferença encontrada entre os tratamentos, a qualidade do sêmen não centrifugado no diluidor citrato-gema com 10% de gema, permaneceu nos padrões aceitáveis para uso em programas de inseminação artificial, sendo recomendado, todavia, testes de fertilidade para comprovação da eficiência do sêmen submetido ao processo de conservação.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

A maior concentração de gema no diluidor (10%) proporcionou maior viabilidade ao sêmen caprino criopreservado a -196°C .

A remoção do plasma seminal não trouxe benefícios à congelação do sêmen caprino em diluído citrato acrescido de 10% de gema.

A criopreservação de sêmen oriundo de bodes jovens (10 meses a 1 ano) proporcionou melhores resultados neste experimento em função deste ter ocorrido no período reprodutivo, no qual a liberação de fosfolipase pelas glândulas bulbo-uretrais é reduzida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing steps of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004.
- AISEN, E. G. Inseminação Artificial de Ovelhas e Cabras, 2008. In: AISEN, E.G. Reprodução Ovina e Caprina. – São Paulo: **Medicina Veterinária** 1ª Ed, 2008.
- ANEL, L.; ALAVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.30-42, 2006.
- ASADPOUR, R.; ALAVI-SHOUSHTARI S. M.; REZAI S. A.; ANSARI, M. H. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 308-313, 2007.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 41, p. 395-406, 1987.
- ÁVILA-PORTILLO, L. M.; MADERO, J. I.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M. F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L. G.; GÓMEZ, C.; LOZANO, J. M.; REGUERO, M. T. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 57, p. 291-300, 2006.
- AZERÉDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.
- BAUBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B. A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1239-1247, 2003.
- 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.
- BEZERRA, F. S. B. Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal área de concentração Produção e Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró. 2009.
- BEZERRA F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelamento. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 4, p. 20-25, 2010.
- BICUDO, S. D.; SOUZA, D. B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 15, 2003. Porto Seguro – BA. Anais... Belo Horizonte - MG: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 2003.
- BILODEAU, J. F. ; BLANCHETTE, S.; CORNER, N.; SIRAD, M-A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, p. 1105-1122, 2002.
- BISPO, C. A. S. Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2005.
- BISPO, C. A. S. Fertilidade do sêmen caprino resfriado ou congelado em diferentes concentrações de gema de ovo no diluente. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M. C. L.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; BISCARDE, C. E.; LEAL, L. S.; OBA, E. Efeito de um quelante de

cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 45, p. 305-312, 2008.

BORTOLOZZO F. P.; BERNARDI, M. L.; BENNEMANN, P. E.; WENTZ, I. Inseminação artificial em suínos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Roca. 395p. 2008.

BRITO, B. G. M. Viabilidade do sêmen caprino conservado em três diferentes diluidores: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2008.

BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060-1067, 2007.

CABRERA, F.; GONZÁLEZ, F.; BATISTA, M.; CALERO, P.; MEDRANO, A.; GRACIA, A. The effect of removal seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 191-195, 2005.

CALDERAM, I. B. K.; MASCHIO, É. F.; MADEIRA, E. M.; ULGUIM, R. R.; RAMBO, G.; CORRÊA, É. K.; LUCIA Jr, T.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1978-1983, 2008.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Congelação do sêmen canino com um diluidor a base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. **Ciência Animal**, v. 10, p. 29-36, 2000.

CARDOSO, J. F. S.; PAULA, N. R. O.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 146-152, 2010.

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

CATUNDA, A. G. V.; CAMPOS, A. C. N.; PEREIRA, J. F.; LIMA, I. C. S.; ARAÚJO, A. A.; MARTINS, G. A. Variação mensal nas concentrações de macroelementos no plasma seminal de caprinos criados em clima tropical úmido. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1177-1185, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 49 p. 1998.

CORTEEL, J. M.; BARIL, G.; LEBOEUF, B. Residual seasonal variations in fertility in selected deep-frozen ejaculates of European dairy male goats. In: **International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, Madrid. Proceedings... Madrid: ICAR, v. 5, p. 422-425, 1980.

CUNHA, I. C. N. Criopreservação do sêmen de cães. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2002.

DASKIN, A.; TEKIN, N. The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora buck semen. **Turkey Journal Veterinary Animal Science**, v. 20, p. 395-398, 1996.

DIAS, J. C. O. Adição de Ringer Lactato, Citrato de Sódio 2,92% e solução Tris em sêmen caprino. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2010.

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

DROBNIS, E. Z.; CROWIE, L. M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREET, J. W.; CROWIE, J. H. Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes:

a demonstration using sperm as a model. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432-437, 1993.

EVANS, G.; MAXWEL, W. M. C. Artificial insemination of sheep and goats. **Butterworth Publishers**, v. 53, p. 25-29, 1987.

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

FAHY, G. M. The relevance of cryopreservation toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v. 3, p. 1-13, 1986.

FARSTAD W. Cryopreservation of canine semen - New challenges. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 336-341, 2009.

FERRARI, S.; BARNABE, V. H. Efeito de dois tipos de diluidores e dois métodos de congelamento na qualidade do sêmen criopreservado de caprinos. **Brazilian Journal Veterinary Research, Animal Science**, v. 36, 1999.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Europe Journal Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA J.F.; BRUSCHI J.H.; ZAMBRINI F.N.; DEMCZUK E.; VIANA J.H.M.; PALHÃO M. P. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 50-53, 2005.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; SODERQUIST, L.; MARTINEZ, H. R. Influence of centrifugation or low extension rates pre freezing on the fertility of sêmen after cervical insemination. **Theriogenology**, v. 57, p. 1781-1792, 2002.

GOMES P. L. N. S.; LIPINSK L. C.; PEREIRA R. J. T. A. Avaliação da necessidade do tempo de equilíbrio no congelamento de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1**, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, p. 809, 2009.

GONZALES, R. A. F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2004.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. 1º ed., Campos dos Goytacazes, 2006.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. H. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

GUERRA, M. M. P.; SOUZA, A. F.; SOARES, A. T.; CÉSAR, C. N. R.; SILVA, S. V.; BATISTA, A. M. Aspectos críticos da congelamento do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 42-49, 2009.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAN, J. K. Cryopreservation of mammalian sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. S.; KAVANAUGH, J. F.; ORIEL JR., L. C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zone free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 390-397, 1995.

HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. **Journal Reproduction Development**, v. 55, p. 50-54, 2009.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transition in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 87, p. 230-473, 1984.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 447-57, 1986.

HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observation with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-23, 2000.

IRITANI, A.; NISCHIKAWA, Y. Studies on the egg-yolk coagulating factors in goat semen: II Properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. In: PROC. SILVER LUBILEE LAB. **Animal Husbandry**, Kyoto University, p. 97-104, 1961.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2011. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf. Acessado em 15 de janeiro de 2012.

KAROW, A. M. Cryobiology for mammalian embryologists, 2001. Disponível em <<http://xytexinternational.com/pdf/cryobiology.pdf>>. Acessado em: 04/10/2011.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide, and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of japanese white rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 511-516, 2006.

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

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-119, 2002.

MEMON, M. A.; 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, p. 473-475, 1985.

MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; SCHEFFEN, B.; ECTORS, F. Pregnancies following transfer of cattle-embryos preserved by vitification. **Cryletters**, v. 7, p. 270-273, 1986.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T. **Cryobiology**. London, New York : Academy press, p. 179-220, 1966.

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

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

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 862-869, 2009.

PALOMINO, L. T.; CAMACHO, J. S.; HUANCA, W. L.; FALCÓN, N. P. Conservación de semen caprino en lós diluidores citrato-yema y leche-descremada yema. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. v. 12, 2001.

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 Science**, v. 35, p. 305-312, 1982.

RODGER, J. C. Seminal plasma, an unnecessary evil? **Theriogenology**, v. 3, p. 237-247, 1975.

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. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

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

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, Á. M.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; ROVAY, H. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1926-1933, 2006.

SANTOS, R. M. Inseminação artificial em cabras. (Monografia) Universidade Tuiuti do Paraná, Paraná. 2007.

SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; TAŞDEMİR U.; KINET, H.; ULUTAŞ, P. A. Effects of different extenders and centrifugation/washing on post thaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 316-323, 2010.

SIMÕES, J.; MASCARENHAS, R.; BARIL, G. Inseminação artificial em caprinos, 2008. Disponível em <http://www.veterinaria.com.pt/media/DIR_174423/Simões215.pdf>. Acessado em: 06/05/2011.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 370-384, 2011.

SILVA, E. C. B. Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes na criopreservação do sêmen de ovinos da raça Santa Inês. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2010.

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

SINGH, B. K. Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda. São Paulo. **Andrei Editora LTDA**, 331p. 2006.

SIQUEIRA, A. P. Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG, 2006.

SIQUEIRA, A. P.; FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M.; PALHARES, M. S.; BRUSCHI, M. C. M.; PEIXOTO, M. P. Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema de ovo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, 2009.

SOARES, M. P. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, v. 32, p. 649-655, 2002.

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

SOLANO, R. F.; MARTO, R.; PEREIRA, H. S. Inseminação artificial em cabras: Avaliação da colocação do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 365-367, 1999.

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

SOUZA A. F.; LEITÃO M. C. G.; BATISTA A. M.; PORTO A. L. F.; FILHO J. L. de L.; GUERRA M. M. P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1166-1172, 2009.

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHEM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1056-1065, 2004.

THIMONIER, J. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. **Journal of Reproduction and Fertility**, supl. 30, p. 30-45, 1981.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB T.; SIEME H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.

TRALDI, A. S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: **FEINCO 3**, 2006.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of season on the freezability of boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**. v 43, p. 1359-1363, 1995.

USTUNER, B.; GUNAY, U.; NUR, A. Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the freezability of Saanen buck semen. **Bull Veterinary Institute Pulawy**, v. 53, p. 369-374, 2009.

VALENTE, S. S.; PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; MARQUES, C. C.; VASQUES, M. I.; PEREIRA, M. V. C. S.; HORTA, A. E. M.; BARBAS, J. P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.74-77, 2010.

VARAGO, F.; MOUSTACAS, V.; CRUZ, B.; LAGARES, M.; HENRY, M. Biotécnicas da reprodução aplicadas a pequenas ruminantes. **Ciência Animal Brasileira**, out. 2009. Disponível em <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7813/5615>>. Acesso em: 05 Out. 2011.

VIANA, A. K. S.; CHALHOUB, M.; FILHO, A. L. R.; ALMEIDA, A. K.; PORTELA, A. P. M.; BITTENCOURT, R. F.; ALVES, S. G. G.; BITTENCOURT, T. C. C.; QUINTELA, A. T. Avaliação in vitro do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 67-76, 2006.

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

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

WILHEM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effect of phosphatidilserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, p. 320-329, 1996.

XAVIER, M. N.; MOUSTACAS, V. S.; CARVALHO JÚNIOR, C. A. Avaliação de diferentes antibióticos na inibição do crescimento de *Brucella ovis* em sêmen ovino congelado. In: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais ... Belo Horizonte*: CBRA, 2009.

ANEXOS

ANEXO A: Composição do diluidor citrato de sódio.

COMPONENTES	QUANTIDADE
ÁGUA DESTILADA	50,0 mL
CITRATO DE SÓDIO MONO-HIDRATADO	1,47 g
PENICILINA G (BENZILPENICILINA) SIGMA®	0.03g

ANEXO B: Composição do diluidor citrato gema (10% gema)

FRAÇÃO 'A'

COMPONENTES	QUANTIDADE
ÁGUA DESTILADA	45,0 mL
GEMA DE OVO	5,0 mL
CITRATO DE SÓDIO MONO-HIDRATADO	1,47 g
PENICILINA G (BENZILPENICILINA) SIGMA®	0.03 g

Composição do diluidor citrato gema (5% de gema).

FRAÇÃO 'A'

COMPONENTES	QUANTIDADE
ÁGUA DESTILADA	47,5,0 mL
GEMA DE OVO	2,5 mL
CITRATO DE SÓDIO MONO-HIDRATADO	1,47 g
PENICILINA G (BENZILPENICILINA) SIGMA®	0.03 g

ANEXO C: Valores de Motilidade e vigor pós-descongelamento, motilidade e vigor pós TTR Rápido, motilidade e vigor pós TTR Lento (1 hora), motilidade e vigor pós TTR Lento (2 horas) no sêmen com 10% de gema com plasma.

10% COM PLASMA									
DIA DE COLETA	PALHETA	MPD (%)	VPD (0-5)	MTTRR (%)	VTTRR (0-5)	MTTRL (1H) (%)	VTTRL (1H) (0-5)	MTTRL (2H) (%)	VTTRL (2H) (0-5)
1	1	20	3	5	2	15	3	20	2
	2	30	3	7.5	2	25	3	7.5	2
	3	30	3.5	5	2	30	3	15	2.5
2	1	30	3	5	1.5	7.5	2	0	0
	2	30	3	5	2	15	2.5	10	2
	3	30	3	5	1	10	2.5	5	2
3	1	40	3	7.5	2	25	3	20	2
	2	40	4	10	2	35	3	30	3
	3	40	4	10	2.5	35	3	30	2.5
4	1	35	4.5	7.5	2	30	3	20	2
	2	30	4	7.5	2	30	3.5	20	2
	3	30	3	7.5	2.5	30	3	25	2.5
5	1	30	3	5	2	30	2.5	10	2
	2	40	4	5	2	20	2.5	10	2
	3	30	3	5	2	20	2.5	10	2.5
6	1	20	3	5	2	15	3	15	3
	2	30	3	5	2	15	3	5	2.5
	3	20	3	5	1	30	2.5	15	2.5

MPD= Motilidade pós-descongelamento

VPD= Vigor pós-descongelamento

MTTRR= Motilidade após Teste de Termoresistência Rápido

VTTRR= Vigor após Teste de Termoresistência Rápido

MTRRL= Motilidade após Teste de Termoresistência Lento

VTTRL= Vigor após Teste de Termoresistência Lento

Valores de Motilidade e vigor pós-descongelamento, motilidade e vigor pós TTR Rápido, motilidade e vigor pós TTR Lento (1 hora), motilidade e vigor pós TTR Lento (2 horas) no sêmen com 5 % de gema com plasma.

5% COM PLASMA									
DIA DE COLETA	PALHETA	MPD(%)	VPD (0-5)	MTTRR (%)	VTTRR (0-5)	MTRRL (1H) (%)	VTTRL (1H) (0-5)	MTRRL (2H) (%)	VTTRL (2H)(0-5)
1	1	20	2.5	0	0	10	2.5	10	3
	2	30	3	5	2	25	4	15	3
	3	30	3.5	10	2	20	3	10	2
2	1	20	4	0	0	0	0	0	0
	2	10	3	0	0	15	3	5	2
	3	20	4	0	0	10	3	5	2
3	1	30	3	10	2	25	3	25	2.5
	2	30	4	5	2	40	3	30	2
	3	30	4	7.5	2	30	3	25	3
4	1	40	3	0	0	10	2	0	0
	2	35	4	0	0	15	3	5	2
	3	30	3	0	0	20	3.5	5	2
5	1	10	2	0	0	25	3	10	2
	2	10	3	0	0	10	2	5	2
	3	35	4	5	2	15	3	7.5	2
6	1	30	3	0	0	5	2	0	0
	2	20	3	0	0	5	2	0	0
	3	20	4	5	1	5	2	0	0

MPD= Motilidade pós-descongelamento

VPD= Vigor pós-descongelamento

MTTRR= Motilidade após Teste de Termoresistência Rápido

VTTRR= Vigor após Teste de Termoresistência Rápido

MTRRL= Motilidade após Teste de Termoresistência Lento

VTTRL= Vigor após Teste de Termoresistência Lento

Valores de Motilidade e vigor pós-descongelamento, motilidade e vigor pós TTR Rápido, motilidade e vigor pós TTR Lento (1 hora), motilidade e vigor pós TTR Lento (2 horas) no sêmen com 10% de gema sem plasma.

10% SEM PLASMA									
DIA DE COLETA	PALHETA	MPD (%)	VPD (0-5)	MTRR (%)	VTTRR (0-5)	MTRRL (1H) (%)	VTTRL (1H) (%)	MTRRL (1H) (%)	VTTRL (1H) (%)
1	1	10	3	0	0	7.5	2	5	1
	2	7.5	2	0	0	10	3	5	1
	3	10	2.5	0	0	10	3	5	2
2	1	15	2	0	0	5	1	0	0
	2	15	2	0	0	5	1	0	0
	3	10	2	0	0	5	1	0	0
3	1	10	2	5	2	10	2	5	1
	2	20	3	0	0	20	3	10	2
	3	20	3	0	0	25	3	10	2
4	1	20	3	0	0	25	3	10	2
	2	15	2.5	0	0	15	3	5	2
	3	10	3	5	1	20	3	5.5	2
5	1	10	2	5	1	5	2	0	0
	2	20	3	5	1	10	2	5	1
	3	20	3	5	1	7.5	2	5	1
6	1	10	2.5	5	2	7.5	1	0	0
	2	10	3	5	2	5	1	5	1
	3	10	2	0	0	5	1	5	1

MPD= Motilidade pós-descongelamento

VPD= Vigor pós-descongelamento

MTTRR= Motilidade após Teste de Termoresistência Rápido

VTTRR= Vigor após Teste de Termoresistência Rápido

MTRRL= Motilidade após Teste de Termoresistência Lento

VTTRL= Vigor após Teste de Termoresistência Lento

Valores de Motilidade e vigor pós-descongelamento, motilidade e vigor pós TTR Rápido, motilidade e vigor pós TTR Lento (1 hora), motilidade e vigor pós TTR Lento (2 horas) no sêmen com 5 % de gema sem plasma.

5% SEM PLASMA									
DIA DE COLETA	PALHETA	MPD (%)	VPD (0-5)	MTTRR (%)	VTTRR (0-5)	MTRRL (1H) (%)	VTTRL (1H) (0-5)	MTRRL (2H) (%)	VTTRL (2H) (0-5)
1	1	20	2	0	0	5	2	5	2
	2	10	2	0	0	5	2	5	2
	3	20	2.5	0	0	10	2	5	2
2	1	20	3	0	0	5	2	0	0
	2	35	4	0	0	5	2	5	2
	3	20	3	0	0	5	2	5	1
3	1	15	4	0	0	7.5	2	5	2
	2	30	4	0	0	15	2	5	2
	3	40	4	0	0	20	2	7.5	2
4	1	20	3	0	0	7.5	2	5	1
	2	30	4	0	0	30	3	5	2
	3	40	3	5	2	20	2	5	2
5	1	20	3	5	2	5	2	5	1
	2	30	4	0	0	0	0	0	0
	3	20	3	0	0	5	1	0	0
6	1	15	3	0	0	5	2	5	1
	2	20	3	0	0	5	1	5	1
	3	20	3	0	0	5	1	5	1

MPD= Motilidade pós-descongelamento

VPD= Vigor pós-descongelamento

MTTRR= Motilidade após Teste de Termoresistência Rápido

VTTRR= Vigor após Teste de Termoresistência Rápido

MTRRL= Motilidade após Teste de Termoresistência Lento

VTTRL= Vigor após Teste de Termoresistência Lento