

CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO

**FERTILIDADE DO SÊMEN CAPRINO RESFRIADO OU  
CONGELADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES  
DE GEMA-DE-OVO NO DILUENTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

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

T

B622f  
2009

Bispo, Charles André Souza, 1976-

Fertilidade do sêmen caprino resfriado ou congelado em  
diferentes concentrações de gema-do-ovo no diluente /  
Charles André Souza Bispo. – Viçosa, MG, 2009.  
xi, 96f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Caprino - Reprodução. 2. Sêmen - Resfriamento. 3.  
Sêmen - Fecundidade. 4. Caprino. Fecundidade.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

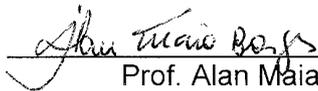
CDD 22.ed. 636.39082

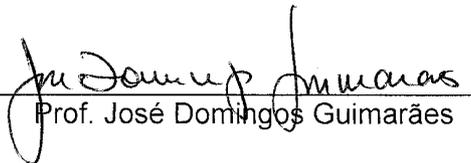
CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO

**FERTILIDADE DO SÊMEN CAPRINO RESFRIADO OU  
CONGELADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES  
DE GEMA-DE-OVO NO DILUENTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2009.

  
Prof. Alan Maia Borges

  
Prof. José Domingos Guimarães

  
Prof. Antônio Bento Mâncio

  
Dr. Cláudio José Borela Espescht

  
Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
(Orientador)

*Senhor, tu me sondas e me conheces<sup>1</sup>.  
Os teus olhos me viram a substância  
ainda informe, e no teu livro foram  
escritos todos os meus dias, cada um  
deles escrito e determinado quando nem  
um deles havia ainda<sup>16</sup>.*

Salmo 139: 1,16.

*A Deus, meu Senhor.  
Aos meus pais, Manoel Bispo dos Anjos  
(in memoriam) e Valdeci Souza Bispo.  
Aos meus irmãos, José Ronaldo, Paulo  
Roberto, Maria Rosicley e Manoel Júnior,  
pelo apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar mais esta oportunidade e pelo cuidado dispensado a mim, todos os dias da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado.

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

À minha mãe, Valdeci Souza Bispo, pelas orações, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação e pela força, imprescindíveis para eu ter concluído mais esta etapa de minha vida profissional.

Aos meus irmãos, José Ronaldo, Paulo Roberto, Maria Rosicley e Manoel Júnior, pela dedicação, pelo amor, pelo exemplo e por serem cada um também meus pais.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas, pelo carinho e pela amizade dispensados ao tio Charles.

Aos meus familiares, pela torcida e pelas orações.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela orientação, pela amizade e confiança.

Ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela amizade, pela confiança e pela concessão do caprill para realização deste trabalho.

Ao professor José Domingos Guimarães, pelas dicas, pelo convívio e pela amizade.

Ao amigo e conselheiro Rogério Fürst, pelo convívio, pela dedicação, pela amizade e pela confiança.

Ao amigo Paulo Moreira, por torcer pelo meu sucesso, pela amizade e consideração.

A todos da Igreja Presbiteriana de Viçosa, pelas orações, pela amizade e pelo cuidado.

Aos amigos e irmãos em Cristo da ABU – Pós, pelo companheirismo, pela amizade, pelo cuidado e pelas orações por minha vida.

Ao meu amigo Alisson Sanguinet, pelo convívio e pela amizade.

Aos amigos de república, Gustavo Mota, Matheus Ornelas e Vinício Nascimento, pela amizade.

O amigo e irmão, Phellipe Kelbert, pelo companheirismo e pelo convívio agradável.

À Celeste, secretária da Coordenação da Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia, pela paciência e dedicação.

A todos os amigos de Pós-Graduação, Miller Palhão, Reno Roldi, Herbert Rovay, Rogério Fürst, Adolfo Lima, Polyana Galvão, Guilherme Pugliese, Guilherme, Pedro Gama, Bruno Filgueiras, Madriano Cristile, Sanely Lourenço da Costa, Joana Souza, Rogério Matos e Clarindo, pelo apoio, pelo companheirismo e pelos bons momentos.

À Sra. Joana, pelo cuidado, e ao Sr. Mauricio, pais da Polyana, pelo apoio logístico muitas vezes necessário.

Aos estagiários, fundamentais na realização deste trabalho. Em especial ao Felipe Andrade, ao Thiago Peixoto, à Aline Rodrigues, à Fernanda Zamuner e à Yamê Fabres.

Aos funcionários do capril da UFV, pela amizade e pelo apoio, sempre prontos a ajudar.

Aos amigos do Instituto Federal Minas Gerais (IFMG), *Campus* São João Evangelista, pelo apoio, pela amizade, pelo companheirismo, pela torcida e compreensão.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO, filho de Manoel Bispo dos Anjos (*in memoriam*) e de Valdeci Souza Bispo, nasceu em Juazeiro, no Estado da Bahia, em 14 de julho de 1976.

Em agosto de 1996, iniciou o Curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife-PE, graduando-se em 1º de fevereiro de 2002.

Em 2 de abril de 2002, iniciou a Pós-Graduação de Aperfeiçoamento Profissional, pela escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, concluindo-a em 27 de julho de 2003.

Em agosto de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se a defesa de dissertação em 1º de agosto de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de doutorado, área de concentração Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de dissertação em 31 de julho de 2009.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Resfriamento do sêmen .....	3
2.2. Congelamento de sêmen .....	8
2.3. Diluentes .....	10
2.4. Crioprotetores não penetrantes .....	10
2.5. Crioprotetores penetrantes .....	15
2.6. Fisiologia reprodutiva da cabra .....	19
2.7. Nutrição e atividade reprodutiva .....	22
2.8. Atividade da glândula pineal .....	22
2.9. Utilização de fotoperíodo artificial .....	23
2.10. Técnica de inseminação artificial via transcervical .....	25
2.11. Muco cervical .....	28
2.12. Horário de inseminação .....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
Características e taxa de fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5°C por 24 horas, em função das concentrações de gema-de-ovo no diluente .....	42
Resumo .....	42
Abstract .....	43

	<b>Página</b>
1. Introdução .....	44
2. Material e Métodos.....	45
3. Resultados e Discussão.....	49
3.1. Sêmen fresco .....	49
3.2. Sêmen resfriado .....	50
3.3. Fertilidade do sêmen resfriado .....	52
4. Conclusão .....	54
5. Referências Bibliográficas.....	55
Avaliação da fertilidade do sêmen caprino congelado em função das concentrações de gema-de-ovo no diluente .....	58
Resumo.....	58
Abstract.....	59
1. Introdução .....	60
2. Material e Métodos.....	61
3. Resultados e Discussão.....	65
3.1. Sêmen fresco .....	65
3.2. Sêmen congelado .....	68
3.3. Fertilidade do sêmen congelado .....	70
4. Conclusão .....	74
5. Referências Bibliográficas.....	74
ANEXO .....	78
ANEXO A.....	79

## RESUMO

BISPO, Charles André Souza Bispo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho, 2009. **Fertilidade do sêmen caprino resfriado ou congelado em diferentes concentrações de gema-de-ovo no diluente.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Coorientadores: Marcelo Teixeira Rodrigues e Ciro Alexandre Alves Torres.

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Reprodução de Caprinos do Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Zona da Mata, no município de Viçosa-MG. Foram realizados três experimentos, sendo o primeiro relacionado ao resfriamento do sêmen e dois referentes ao congelamento do sêmen caprino. O primeiro experimento foi realizado durante a estação reprodutiva fisiológica dos caprinos no Brasil (março a junho). O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, quais as concentrações de gema-de-ovo (Tratamento 1 – T1 = 20% ou Tratamento 2 – T2 = 2,5%) preservam melhor o sêmen caprino armazenado a 5°C, por 24 horas, em diluente citrato-gema-de-ovo. Os valores médios obtidos para o sêmen fresco quanto a volume (mL), motilidade (%), vigor (1-5), concentração espermática ( $\times 10^9$  totais), teste hiposmótico (%) e coloração supravital (%) foram de  $0,7 \pm 0,3$ ,  $87,9 \pm 3,3$ ,  $3,9 \pm 0,3$ ,  $1,3 \pm 0,6$ ,  $72,7 \pm 7,8$  e  $78,2 \pm 9,3$ , respectivamente. Os valores médios referentes ao sêmen resfriado nos tratamentos foram, respectivamente, para T1 e T2 de: motilidade,  $68,5 \pm 15,4$  e  $78,0 \pm 5,5$ ; vigor,  $2,5 \pm 0,6$  e  $3,2 \pm 0,3$ ;

supravital,  $59,4 \pm 17,2$  e  $71,1 \pm 10,5$  e hiposmótico,  $42,2 \pm 15,7$  e  $56,2 \pm 11,5$  ( $p < 0,05$ ). As taxas de fertilidade obtidas foram de 31,2% (T1) e 66,6% (T2) ( $p < 0,05$ ) e a prolificidade foi de  $1,3 \pm 0,5$  (T1) e  $1,4 \pm 0,5$  (T2) ( $p > 0,05$ ). De acordo com os resultados obtidos, pode-se recomendar a utilização do diluidor citrato-gema-de-ovo com baixa concentração de gema (2,5%) no seu volume total. Os experimentos 2 e 3 foram realizados durante a estação reprodutiva induzida por suplementação de luz (novembro a dezembro de 2007) e estação fisiológica (março a junho de 2008). O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e fertilidade *in vivo*, quais as concentrações de gema-de-ovo (25 e 2,5%) presentes no diluente de Martin *et al.* (1979) preservam melhor o sêmen caprino congelado durante as diferentes épocas do ano. Os valores médios obtidos no Experimento 2 para o sêmen fresco, quanto ao volume, à motilidade, ao vigor, à concentração espermática, ao teste hiposmótico e à coloração supravital, foram de  $1,3 \pm 0,4$ ;  $87,5 \pm 2,6$  e  $3,8 \pm 0,3$ , respectivamente, e no Experimento 3, de  $1,2 \pm 0,1$ ;  $90,0 \pm 3,7$  e  $3,8 \pm 0,4$ , respectivamente. Os valores médios referentes ao sêmen congelado para o Experimento 2 foram, respectivamente, para T1 e T2 de: motilidade,  $58,7 \pm 5,1\%$  e  $61,2 \pm 5,1\%$ ; vigor,  $2,7 \pm 0,3$  e  $3,1 \pm 0,2$ ; supravital,  $58,7 \pm 7,5$  e  $61,7 \pm 6,15$ . No Experimento 3 foram respectivamente para T1 e T2 de: motilidade,  $54,3 \pm 6,2\%$  e  $60,6 \pm 4,1\%$ ; vigor,  $2,6 \pm 0,2$  e  $3,1 \pm 0,2$ ; supravital,  $56,3 \pm 8,1$  e  $57,7 \pm 6,8$ . As taxas de fertilidade obtidas foram de 46,67% (T1) e 70,00% (T2) no Experimento 2 e no Experimento 3, de 50,00% (T1) e 76,00% (T2). De acordo com os resultados obtidos, pode-se recomendar a utilização do diluente glicose-EDTA com baixa concentração de gema (2,5%) no seu volume total.

## ABSTRACT

BISPO, Charles André Souza Bispo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Fertility of cooled or frozen goat semen in different concentrations of egg yolk in semen extender.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: Marcelo Teixeira Rodrigues and Ciro Alexandre Alves Torres.

The experiments were conducted on Laboratory of Goat Reproduction in Goat Production Sector of Animal Science Department, Federal University of Viçosa, Zona da Mata, in Viçosa-MG. Three experiments were conducted; the first is related to cooling of semen and two others for freezing of goat semen. The first experiment was conducted during the physiological breeding season of goats in Brazil (March-June). The objective of this study was to evaluate, through in vitro and in vivo, what the concentrations of egg yolk (treatment 1 - T1 = 20% or Treatment 2 - T2 = 2.5%) preserve better the goat semen stored at 5 °C for 24 hours in citrate-egg yolk extender. The average values for fresh semen of volume (mL), motility (%), vigor (1-5), sperm concentration ( $\times 10^9$  total), hypoosmotic swelling test (%) and supravital staining (%) were  $0.7 \pm 0.3$ ,  $87.9 \pm 3.3$ ,  $3.9 \pm 0.3$ ,  $1.3 \pm 0.6$ ,  $72.7 \pm 7.8$  and  $78.2 \pm 9.3$ , respectively. The average values for cooled semen by the treatments were, respectively, for T1 and T2: motility,  $68.5 \pm 15.4$  and  $78.0 \pm 5.5$ , vigor,  $2.5 \pm 0.6$  and  $3.2 \pm 0.3$ , supravital,  $59.4 \pm 17.2$  and  $71.1 \pm 10.5$  and hypoosmotic,  $42.2 \pm 15.7$  and  $56.2 \pm 11.5$  ( $p < 0.05$ ). Fertility rates obtained were 31.2% (T1) and 66.6% (T2) ( $p < 0.05$ ) and prolificacy was  $1.3 \pm 0.5$  (T1) and  $1.4 \pm 0.5$  (T2) ( $p < 0.05$ ).

According to the results, we can recommend the use of this extender with a low concentration of egg yolk (2.5%) in total volume. Experiments 2 and 3 were performed during the breeding season induced by supplementary light (November-December 2007) and physiological season (March to June 2008). The objective of this study was to evaluate, through tests *in vitro* and fertility *in vivo*, what is the concentrations of egg yolk of egg (25 and 2.5%) present in the extender (Martin et al.1979) can better preserve frozen goat semen during the different seasons. The average values obtained in Experiment 2 for fresh semen, as the volume, motility, vigor, sperm concentration, hypoosmotic swelling test and supravital staining, were  $1.3 \pm 0.4$ ,  $87.5 \pm 2.6$  and  $3.8 \pm 0.3$ , respectively, and in Experiment 3,  $1.2 \pm 0.1$ ,  $90.0 \pm 3.7$  and  $3.8 \pm 0.4$ , respectively. The average values for frozen semen of Experiment 2 were, respectively, for T1 and T2: motility,  $58.7 \pm 5.1\%$  and  $61.2 \pm 5.1\%$ ; vigor,  $2.7 \pm 0.3$  and  $3.1 \pm 0.2$ ; supravital,  $58.7 \pm 7.5$  and  $61.7 \pm 6.15$ . In Experiment 3 were respectively for T1 and T2: motility,  $54.3 \pm 6.2\%$  and  $60.6 \pm 4.1\%$ ; vigor,  $2.6 \pm 0.2$  and  $3.1 \pm 0.2$ ; supravital,  $56.3 \pm 8.1$  and  $57.7 \pm 6.8$ . Fertility rates obtained were 46.67% (T1) and 70.00% (T2) in Experiment 2. In Experiment 3 the fertility rates were 50.00% (T1) and 76.00% (T2). According to the results obtained, we can recommend the use of glucose-EDTA extender with low concentration of egg yolk (2.5%) in total volume.

## 1. INTRODUÇÃO

O final do século passado foi marcado por uma ampliação mundial dos rebanhos caprinos e ovinos. Este aumento, da ordem de 20% nas duas últimas décadas (1979 a 1998), acompanhou o crescimento da população mundial, observado principalmente nos países em desenvolvimento, enquanto os países desenvolvidos mantiveram seus rebanhos estáveis (FAO, 2005).

Na caprinocultura leiteira, o incremento nos rebanhos não foi acompanhado necessariamente pelo aumento na produtividade animal, exceto nos países que culturalmente possuem uma caprinocultura forte, onde se observa um constante trabalho de melhoramento genético desses animais. Em nosso país, onde a produção leiteira média dos animais gira em torno de 1kg/cabra/dia, o processo de melhoramento dos rebanhos caprinos não acompanhou a tendência de modernização e intensificação dos sistemas de produção agropecuários, praticando-se, principalmente, uma pecuária pouco tecnificada e composta por animais de genética inferior.

Por outro lado, apesar de ser considerada uma atividade milenar e a carne de caprinos ter grande importância como fonte básica de proteína animal para diversos povos, a criação de caprinos para corte nunca despertou tanto interesse da mídia, dos pesquisadores e do público em geral, como vem ocorrendo nos últimos anos.

Apesar de ser uma carne mundialmente pouco consumida quando observadas as estatísticas oficiais (FAO, 1999), 0,63 kg *per capita* ao ano), é

tida por muitos como a carne vermelha mais consumida no mundo. Informações tão opostas podem ser até certo ponto compreendidas se considerado seu grande consumo em países em desenvolvimento, com serviços de informação bastante deficitários, além de seu consumo diretamente nas propriedades e sua comercialização ocorrer basicamente em mercados informais.

O Brasil tem despontado no cenário agropecuário mundial. Esta identidade brasileira com o agronegócio tem atraído grandes investimentos para o setor, estimulando os produtores a intensificar sua produção e melhorar seus plantéis. Desta forma, a caprinocultura, tanto de corte quanto de leite, tem despertado grande interesse dos empresários, surgindo como uma boa opção para aumentar os ganhos com a atividade rural.

O atual cenário agropecuário mostra-se favorável para o crescimento sustentável da caprinocultura. Esta sustentabilidade da atividade se apoia em uma uniformidade na oferta dos produtos, aliada à produção em escala, dois pontos fundamentais para a criação do hábito de consumo tanto de derivados lácteos como de carne e pele de origem caprina. O melhoramento genético dos rebanhos, acompanhado da melhoria no manejo nutricional, forma o alicerce para o desenvolvimento estruturado da caprinocultura nacional. Trabalhando-se com animais mais produtivos e mantendo os manejos alimentar e sanitário adequados, é possível alcançar maior escala de produção e promover a uniformidade na oferta do produto (HAENLEIN, 2001).

Diante deste contexto, a inseminação artificial é uma das biotecnologias da reprodução de grande relevância que vem sendo desenvolvida há vários anos e que permite o rápido avanço genético, com melhor aproveitamento de reprodutores de características produtivas superiores, sejam para produção de leite ou carne (PALOMINO *et al.*, 2001).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Resfriamento do sêmen

Para conservação de células espermáticas de caprinos são utilizadas duas técnicas básicas: o congelamento e o resfriamento (NUNES, 2001). Na primeira, mantém-se o sêmen congelado à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C), por tempo indeterminado, podendo aproveitar os reprodutores machos mesmo durante a contraestação reprodutiva, intensificando o uso dos reprodutores, ou até mesmo após sua morte. Na segunda técnica, o sêmen é mantido em temperatura controlada na faixa entre 15 e 4°C, mantendo sua fertilidade por um período de 12 a 24 horas (FERNANDEZ-ABELLA, 2003). É indicado também para o transporte de sêmen entre propriedades e para utilização durante a estação de monta, quando um grande número de fêmeas entra em estro simultaneamente, com a vantagem de não necessitar de grandes investimentos iniciais.

Para o sucesso na preservação dos espermatozoides pelo resfriamento, é necessário seguir uma série de passos que visam à redução nos danos causados às células e que assegurem a longevidade *in vitro* e *in vivo*, a saber: taxa da diluição adequada, diluentes, substâncias protetoras, taxas adequadas de resfriamento (FASTAD, 1996) e manutenção em temperaturas específicas que reduzam o metabolismo, minimizem os danos na membrana e não

desencadeiem prematuramente a capacitação e a reação acrossômica (LOOMIS, 1992).

Quando o sêmen é resfriado a temperaturas de 4 a 5°C, as células espermáticas devem ser protegidas contra lesões na membrana plasmática e receber um suporte nutricional, de maneira que sustente o metabolismo basal dessas células durante o período de estocagem. Desta maneira, substâncias ricas em lipoproteínas, como o leite, a gema-de-ovo, os açúcares (glicose, lactose, frutose, manose, rafinose e trealose), são utilizadas com função crioprotetora durante o processo de resfriamento do sêmen (MCKINNON, 1996).

O frio é o agente mais eficaz para a conservação do sêmen líquido, embora em temperatura de 5°C a atividade metabólica dos espermatozoides persista, ainda que bastante diminuída. Quinn *et al.* (1980) relatam que os espermatozoides de muitos animais são sensíveis às modificações que possam ocorrer entre 15 e 0°C. Este efeito brusco do frio provoca o enrolamento da cauda dos espermatozoides, além de ocorrer maior contração da bainha lipoproteica em relação ao conteúdo celular, o que favorece fraturas no envoltório celular, com a evasão de conteúdo intracelular como enzimas, lipoproteínas, potássio, fosfolipídios e ATP (MIES FILHO, 1987).

O conhecimento obtido sobre as membranas plasmáticas está baseado no modelo do mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson (1972), na qual os lipídios estão livres, movimentando-se lateralmente e, portanto, proporcionando fluidez à membrana. Em temperatura de 37°C, os lipídios encontram-se em estado fluido e dispostos de forma aleatória. Quando há diminuição da temperatura do meio em que essas células estão contidas, ocorre um alongamento das cadeias de ácidos graxos, resultando no aumento da sua rigidez. Então os fosfolipídios semelhantes tendem a se agrupar, dando origem a estruturas cristalinas de forma hexagonal, e somente uma porção pequena desses fosfolipídios mantém-se na forma líquida. Esse arranjo irá favorecer o deslocamento das proteínas para esses locais, as quais se fundem e, conseqüentemente, formam agregados proteicos que resultam em aumento da permeabilidade da membrana e na diminuição do metabolismo celular (AMANN; PICKETT, 1987; STRYER, 1988; AMANN; GRAHAM, 1993).

Esses danos, previamente descritos, são denominados choque térmico. O termo refere-se às mudanças que ocorrem quando os espermatozoides passam de temperatura corpórea (37°C) até 0°C de forma rápida, ou seja, a queda de temperatura é muito rápida. Os danos sofridos pelas células espermáticas são irreversíveis, sendo caracterizados por movimento anormal, ou seja, ocorre comprometimento do padrão de motilidade progressiva, perda de motilidade, danos ao acrossoma e à membrana plasmática; aumento da permeabilidade celular; redução do metabolismo; e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

Em equinos os danos causados pelo choque térmico podem ser minimizados quando as células espermáticas são submetidas a taxas de resfriamento lentas, na faixa de temperatura entre 20 e 4°C (PICKET; AMANN, 1993). Na literatura consultada somente o trabalho de Machado e Simplicio (1995) informa que a taxa de resfriamento do sêmen caprino deve ficar entre -0,25 e -0,35°C/minuto, mas não foi encontrada comparação entre diferentes taxas de resfriamento.

O diluente à base de leite desnatado é considerado um dos mais utilizados extensores de sêmen caprino para uso na inseminação artificial. A capacidade de fertilização dos espermatozoides estocados em diluente de leite ou à base de leite é de aproximadamente 12 a 24 horas. O leite é um meio fisiológico, porém complexo. Por isso, este componente apresenta-se com muitas variações nos resultados obtidos, e seus mecanismos de ação para preservação celular não estão bem elucidados (LEBOEUF *et al.*, 2003).

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

Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao leite, alguns autores observaram a presença de fatores tóxicos aos espermatozoides bovinos no leite não aquecido (THACKER *et al.*, 1954). Boyd *et al.* (1954) sugeriram que o leite fresco, desnatado ou integral, seja aquecido ou tratado quimicamente com substâncias que contêm radicais sulfidrilas com o propósito de aumentar a viabilidade dos espermatozoides bovinos. Esse fator tóxico foi destacado por

Mies Filho (1987) como sendo uma lactenina, um agente enzimático antiestreptococos encontrado no leite, e que para eliminá-lo é necessário o aquecimento do diluente a 95°C, durante 10 minutos.

Em caprinos, a depreciação na sobrevivência espermática durante o armazenamento em diluentes à base de leite não é somente devido a fatores deletérios presentes no diluente, mas também devido a uma fração proteica semelhante à da glândula bulbouretral do bode, que interage com os constituintes do leite presentes no diluente, inibindo consideravelmente a motilidade dos espermatozoides caprinos. Os componentes responsáveis por esse efeito têm sido purificados, caracterizados e identificados com uma triacilglicerol lipase (PELLICER, 1995). Essas frações proteicas são nomeadas de SBU III da glândula bulbouretral do bode (NUNES, 1982, citado por LEBOEUF *et al.*, 2000). A adição da SBU III em meio contendo sêmen lavado resultou em diminuição da viabilidade espermática, quando esse estava em meio à base de leite; quando o sêmen foi diluído em solução de krebsringer-fosfato-glicose, a SBU III não teve efeito. Estes resultados evidenciam que qualquer enzima das glândulas bulbouretrais atuaria nos componentes da SBU III, desencadeando a produção de produtos tóxicos aos espermatozoides.

Devido a essa complexidade da composição do leite, existem componentes que podem ser benéficos ou prejudiciais aos espermatozoides. Algumas frações do leite, como o ultrafiltrado, o microfiltrado e a lactoalbumina, diminuem a longevidade espermática, porém outras, como as proteínas solúveis e o foscaseinato nativo, exercem efeito protetor (BATELIER *et al.*, 1997).

A gema-de-ovo é um dos constituintes mais utilizados como base dos diluentes de sêmen dos animais domésticos. Depois que Phillips e Lardy (1940) relataram que a gema-de-ovo era benéfica à preservação de espermatozoides submetidos ao frio, esta foi incorporada de forma habitual na maioria dos protocolos de conservação seminal. A gema-de-ovo protege contra o choque pelo frio (WATSON, 1981), devido à presença das frações lipoproteicas de baixa densidade na sua composição. Essa proteção se deve à presença de fosfolipídios, que agem na superfície celular, restaurando a perda de fosfolipídios que ocorre durante o choque térmico e prevenindo, conseqüentemente, a ruptura da membrana celular (FASTAD, 1996). Watson

(1995) destacou, além da proteção da gema-de-ovo aos espermatozoides, que essa ação não é efetiva em todas as espécies. A prevenção conferida pelos lipídios com relação ao choque térmico parece estar ligada à quelação dos íons cálcio do meio, evitando sua entrada no espermatozoide (WILHEM *et al.*, 1996).

Apesar dos benefícios que foram evidenciados sobre a utilização da gema-de-ovo em diluentes de sêmen, alguns autores sugerem a sua utilização de forma diferenciada quando o sêmen é proveniente da espécie caprina. Roy (1957) afirmou que diluentes que contêm gema-de-ovo em sua composição não são recomendados para a utilização em sêmen caprino. Tal evidência deve-se ao fato de o plasma seminal caprino conter uma enzima secretada pelas glândulas bulbouretrais, que quando em presença da gema-de-ovo, por hidrólise, leva à formação de lisolecitinas, substâncias estas tóxicas para a célula espermática.

Como alternativa, Cortel (1974) sugeriu remover o plasma seminal por meio da lavagem dos espermatozoides imediatamente após a coleta, pois houve incremento da motilidade espermática e do porcentual de células vivas durante a estocagem quando foram utilizados diluentes à base de gema-de-ovo. Para a retirada do plasma seminal, o autor usou solução fisiológica de krebs-ringer-fosfato. Na tentativa de tornar o processo menos laborioso, Souza e Mies Filho (1986) testaram uma solução de citrato de sódio a 3% para a lavagem do sêmen, em substituição à solução de krebs-ringer-fosfato, e não encontraram nenhuma diferença significativa.

Na busca de tornar o processo de conservação celular mais prático e menos danoso às células espermáticas, Evans e Maxwell (1987) propuseram a utilização de um diluente com baixa concentração de gema-de-ovo (2,6%). Mais recentemente, com o mesmo diluente utilizado por esses autores, Azerêdo *et al.* (2001) avaliaram a ausência ou presença do plasma seminal no sêmen fresco e após o congelamento. As amostras que não foram submetidas à retirada do plasma foram mais bem conservadas, tanto a fresco, como após o descongelamento. Mediante os resultados encontrados, os autores afirmam que a remoção do plasma seminal causou redução significativa do porcentual de espermatozoides móveis, bem como a diminuição dos danos à membrana plasmática. Do mesmo modo, Nunes (1982), citado por Leboeuf *et al.* (2000),

acrescentou que os produtos oriundos das glândulas acessórias possuem componentes importantes na preservação dos espermatozoides de bode.

## **2.2. Congelamento de sêmen**

A possibilidade de armazenar doses de sêmen por um período indefinido de tempo para posterior utilização é uma das maiores vantagens da utilização do sêmen congelado nos programas de inseminação artificial para a maioria das espécies domésticas.

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado foi revolucionada há aproximadamente 50 anos, através da descoberta do glicerol como crioprotetor, o que permitiu que o espermatozoide fosse congelado e armazenado por longos períodos (HOLT, 2000).

Em caprinos, o sêmen foi congelado pela primeira vez por Smith e Polge (1950), e os autores se reportaram à fertilidade pós-descongelação do sêmen dessa espécie como muito baixa para ser considerada de valor prático. Muitas investigações têm sido desenvolvidas sobre a criopreservação do sêmen caprino e todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF *et al.*, 2000).

Os eventos ocorridos durante a criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura (como descrito no resfriamento), desidratação celular, congelamento e descongelação (MEDEIROS, 2002).

As maiores causas de mortalidade espermática durante o processo de congelamento se devem ao fato de que ocorre aumento das concentrações de sais, formação de gelo no interior da célula espermática, mudanças do pH, desnaturação de proteínas e ruptura mecânica dos elementos estruturais da célula durante os processos de mudança de fase, tanto no processo de congelamento, como no descongelamento dessas células. Esses danos só são minimizados ao adicionar os crioprotetores ao meio diluidor (SQUIRES *et al.*, 1999; SALAMON; MAXWELL, 2000); pois esses são importantes para evitar a formação de gelo intracelular (MEDEIROS, 2002). Essas substâncias são classificadas como penetrantes e não penetrantes, ou intra e extracelulares (GRAHAM, 1996; ARRUDA, 2000). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado no congelamento de sêmen, uma vez que atua na proteção das estruturas celulares, tanto intra como extracelularmente; o glicerol aumenta o número de

canais de solvente que permanecem não congelados e dilui as altas concentrações de sal (GRAHAM, 1996).

Dentre as contribuições dos crioprotetores, uma delas, já elucidada, é que durante o processo de congelamento a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre aumento na temperatura necessária para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozoide, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES, 1999). A temperaturas em torno de  $-5^{\circ}\text{C}$  a água intra e extracelular permanece super-resfriada e não cristaliza. Entre  $-5^{\circ}$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular, que permanece super-resfriado, e ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular ocasionando, a desidratação celular. Nesse ponto, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, até ocorrer o colapso da membrana (MEDEIROS, 2002).

Apesar da praticidade e possibilidade de armazenamento do sêmen por período indeterminado, a viabilidade do sêmen congelado/descongelado em geral é menor do que quando se utiliza o sêmen resfriado. Apesar de imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelamento, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozoide, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000).

As lesões ocasionadas pelo processo de congelamento têm sido atribuídas às mudanças de temperatura, à formação de cristais de gelo, aos danos oxidativos, às alterações na membrana do espermatozoide no DNA, à toxicidade do crioprotetores e ao estresse osmótico (WATSON, 1995, 2000). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico associado à adição e remoção de crioprotetores, assim como às alterações na concentração de soluto durante o congelamento (WATSON, 2000).

### **2.3. Diluentes**

A função de um diluente utilizado na criopreservação do sêmen de qualquer espécie é oferecer fontes de energia às células espermáticas, protegê-las de danos relacionados com as variações bruscas de temperatura (choque térmico) e manter um ambiente adequado para que os espermatozoides sobrevivam temporariamente. Em geral, cada um dos diferentes componentes tem sido estudado separadamente e em combinação entre eles, de forma a maximizar viabilidade espermática pós-descongelamento e fertilidade. A maioria dos meios de congelamento de sêmen caprino inclui algum ou alguns crioprotetores não penetrantes (leite ou gema-de-ovo), um crioprotetor penetrante ou associações (glicerol, etilenoglicol, ou dimetilsulfóxido), um tampão (Tris ou Test), um ou mais açúcares (glicose, lactose, rafinose, sacarose, ou trealose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e de antibióticos (penicilina, estreptomicina) (EVANS; MAXWELL, 1987).

### **2.4. Crioprotetores não penetrantes**

Algumas substâncias, como lipídeos, proteínas e macro-moléculas são acrescentadas na confecção dos diluentes. Estas são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelamento, sem que para isso necessitem penetrar no espermatozoide. Em geral a gema-de-ovo, o leite e alguns açúcares são utilizados como fornecedores dessas substâncias (KEITH, 1998).

A gema-de-ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que se aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando, com isso, a membrana do espermatozoide (MOUSSA *et al.*, 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídeos e aparentemente induzindo a alteração transitória de sua composição, conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana (FARSTARD, 1996). Os fosfolipídeos que compõem a fração LDL da gema-de-ovo protegem o sêmen especificamente

durante o processo de resfriamento a 5°C. O uso de fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bode e touros contra o choque térmico. Os lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozoide de bovinos e garanhões dos danos do processo de congelamento, possivelmente por prevenir as alterações deletérias durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996).

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

Os açúcares atuam por meio da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula, de modo a reduzir a injúria causada pela cristalização de gelo (AISEN, 2002). Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substrato energético para o espermatozoide durante a incubação (YILDIZ *et al.*, 2000), conferem proteção à membrana plasmática durante a congelação e a descongelação através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídeos. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos, sacarose e trealose, são os mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, a inibição da fusão de membranas e a manutenção de lipídeos em uma fase fluida na ausência de água (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; CROWE *et al.*, 1987).

Da mesma forma que a gema-de-ovo, os diluentes à base de leite têm sido utilizados para conservação do sêmen caprino, seja ele resfriado ou congelado.

O leite é uma substância fisiológica bastante complexa. Seus componentes apresentam muitas variações, o que influencia nos resultados obtidos nos congelamentos, e seus mecanismos de ação para preservação celular não estão bem elucidados (LEBOEUF *et al.*, 2003).

Entre as frações purificadas do leite, o fosfocaseinato nativo foi destacado como sendo o componente mais eficiente em preservar a motilidade e manter a fertilidade do sêmen. O fosfocaseinato nativo é composto pelas caseínas do leite ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\text{K}$ ) (LEBOEUF *et al.*, 2003). O método de purificação usado mantém sua estrutura tridimensional e a interação natural que ocorre entre eles. Na espécie equina, constatou-se que a  $\beta$ -lactoglobulina, uma proteína solúvel do leite, teve efeito protetor para a célula espermática (BATELIER *et al.*, 1997). Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao leite, alguns autores observaram a presença de fatores tóxicos aos espermatozoides bovinos no leite não aquecido (THACKER *et al.*, 1954). Boyd *et al.* (1954) sugeriram que o leite fresco, desnatado ou integral, seja aquecido ou tratado quimicamente com substâncias que contêm radicais sulfidrilas, com o propósito de aumentar a viabilidade dos espermatozoides bovinos. Esse fator tóxico foi destacado por Mies Filho (1987) como sendo uma lactenina, um agente enzimático antiestreptococos encontrado no leite, e que para eliminá-lo é necessário o aquecimento do diluente a 95°C, durante 10 minutos.

No entanto, várias modificações na estrutura do leite podem ser induzidas pelo aquecimento, como: aumento do diâmetro das micelas de caseína, desnaturação parcial de enzimas e proteínas, liberação de grupos sulfidrilas e diminuição na concentração de minerais devido à absorção de íons para as micelas de caseína. A desnaturação enzimática parece ser a modificação do leite mais importante para explicar a diferença na sobrevivência espermática entre o leite desnatado e o leite tratado pelo processo de ultra-alta temperatura (UAT), uma vez que o calor afeta somente as frações que contêm proteínas solúveis (BATELIER *et al.*, 1997).

Devido à complexidade da composição do leite, que pode variar de acordo com o fabricante, existem componentes que podem ser benéficos ou prejudiciais aos espermatozoides. Algumas frações do leite, como o ultrafiltrado, o microfiltrado e a  $\alpha$ -lactoalbumina, diminuem a longevidade espermática, porém outras, como as proteínas solúveis e o fosfocaseinato nativo, exercem efeito protetor (BATELIER *et al.*, 1997).

De forma diferente, porém não menos importante, os açúcares atuam na desidratação celular, por meio da pressão osmótica, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula, de modo a diminuir a injúria causada

pela cristalização de gelo (AISEN, 2002). Quando substâncias não penetrantes são adicionadas ao diluente, dentre elas a lactose, a sacarose, a rafinose, a trealose e a dextrose, diversos efeitos podem ser observados.

Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substratos energéticos para o espermatozoide durante a incubação (YILDIZ *et al.*, 2000), conferem proteção à membrana plasmática durante a congelação e a descongelação, através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídeos. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos, sacarose e trealose, são os mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, a inibição da fusão de membranas e a manutenção de lipídeos em uma fase fluida na ausência de água (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; CROWE *et al.*, 1987).

Aboagla e Terada (2003) observaram que a concentração de 375 mM de trealose resultou em significativamente maior motilidade espermática total (78%), motilidade progressiva (61%) pós-descongelamento, em relação a outras concentrações utilizadas. Destaca-se que a trealose também provoca aumento na fluidez da membrana celular devido à reorganização das proteínas e fosfolipídios, suprimindo, assim, os efeitos deletérios da fase de transição lipídica. Este fato significa menor dano celular, devido à formação de menos gelo intracelular e, conseqüentemente, mais células viáveis recuperadas após criopreservação.

A dextrana também pode ser usada como crioprotetor não penetrante juntamente com a gema-de-ovo em meios que não contêm glicerol. Com a adição desse composto ao meio de congelamento, foram obtidas médias de 23 e 25% de rendimento total e motilidade progressiva, pós-descongelamento, respectivamente (KUNDU *et al.*, 2002).

Além dos açúcares, alguns aminoácidos também têm sido utilizados como crioprotetores impermeáveis à membrana, como: L-prolina, L-alanina, glicina e L-glutamina (KUNDU *et al.*, 2001). Na natureza, muitos seres vivos acumulam aminoácidos em resposta a baixas temperaturas. Os aminoácidos

têm papel importante na prevenção da desnaturação de proteínas musculares durante o armazenamento de peixes congelados. A glutamina, a prolina e a alanina têm ainda potencialidade como crioprotetoras de fibroblastos de hamster. Alguns estudos têm sido executados, utilizando esses aminoácidos como crioprotetores para a preservação de células espermáticas. Os autores relatam que esses aminoácidos exercem uma proteção ainda maior quando combinado com o glicerol e o dimetilsulfóxido, obtendo-se melhor motilidade pós-descongelamento.

Dentre as alternativas com baixa quantidade de fosfolipídios surgiu a água-de-coco, que em experimentos *in vitro* e *in vivo* exibiu bom comportamento no que se refere ao vigor e à motilidade dos espermatozoides vivos e à fertilidade (NUNES, 1986).

A fim de determinar a fração da água-de-coco que atua sobre os espermatozoides, Nunes *et al.* (1994) realizaram o seu fracionamento e observaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol acético (IAA), substância com ação hormonal estimuladora do crescimento de vegetais, que ativa o metabolismo dos espermatozoides. A presença do IAA pode variar de acordo com o estágio de maturação e da espécie do fruto e, conseqüentemente, influir nos resultados *in vitro* e *in vivo* do sêmen diluído em diferentes composições da água-de-coco (NUNES; SALGUEIRO, 1999).

A introdução do IAA na composição de diluentes convencionais do sêmen de diferentes espécies conferiu aos espermatozoides um incremento de motilidade, aumentando a taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais longos (CRUZ, 1994; NUNES *et al.*, 1994).

No entanto, a utilização de forma mais intensiva da água-de-coco está limitada, principalmente, à inexistência de padronização desse produto, uma vez que está na dependência dos vários fatores fisiológicos inerentes à planta. Uma série de fatores como variedade, tipo de cultivar, idade, sanidade e fatores ambientais influencia substancialmente sua complexa composição. Sua labilidade tem, inclusive, dificultado os esforços de alguns pesquisadores, muitos deles ligados à industrialização, de obter na prateleira a água-de-coco *in natura*, sob forma estável e duradoura.

Em 1997 iniciou-se um estudo que levou à padronização do fruto que seria o ideal para utilização em processos biotecnológicos. Uma vez

selecionado o fruto ideal, buscou-se a estabilização da água-de-coco, fato logrado no início de 2002.

Com base nos primeiros resultados obtidos com a água-de-coco *in natura*, a padronização e a estabilização da água-de-coco na forma de pó (ACP), não perdendo suas características físico-químicas, garantem a simplificação de sua utilização, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias. Tal fato propiciou a padronização dos meios de conservação até então em estudo, não só para sêmen, como para outros tipos celulares.

A sua utilização está baseada na padronização e estabilização da água-de-coco na forma de pó (ACP) e na subsequente formulação dos meios de conservação, em que são acrescentados aditivos específicos, dependendo do tipo de material biológico a ser conservado.

## **2.5. Crioprotetores penetrantes**

Muitos crioprotetores permeáveis à membrana (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol e propilenoglicol), e suas combinações, foram testados na criopreservação do sêmen caprino (RITAR *et al.*, 1990a, b; TULI; HOLTZ, 1994; SINGH *et al.*, 1995; KUNDU *et al.*, 2000; LEBOEUF *et al.*, 2000), no entanto o mais comumente utilizado é o glicerol.

A descoberta da ação glicerol foi de grande importância na criopreservação de sêmen, pois até então este evento não era possível (KEITH, 1998; HOLT, 2000a), sendo atualmente o agente mais utilizado nas espécies mamíferas domésticas (FARSTARD, 1996).

Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que ele penetra na membrana celular através da difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma (PARK; GRAHAM, 1992). Embora a concentração de crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é 30 a 60 vezes menor do que a da água (GRAHAM, 1996). Assim sendo, essas moléculas atravessam a membrana até atingir um equilíbrio, porém a água o faz mais rapidamente, ocasionando o enrugamento da célula devido à pronta saída de água para diluir a alta concentração externa, e somente depois de um período é que o crioprotetor penetra e equilibra as

concentrações intra e extracelulares. Nessas condições a água retorna para o interior da célula até atingir o equilíbrio, que resulta na retomada do seu tamanho normal (SEIDEL, 1996). O crioprotetor pode causar danos osmóticos aos espermatozoides, mas a extensão do dano está relacionada com a espécie animal em questão. No entanto, espermatozoides de caprinos são razoavelmente tolerantes a essas condições e podem resistir sem maiores problemas à exposição ao glicerol. O crioprotetor reduz o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interações com íons e macromoléculas, assim como redução do ponto de congelação da água (MEDEIROS *et al.*, 2002). Como a célula agora tem menos água intracelular, o ponto de congelamento da célula é diminuído e menos gelo intracelular irá se formar, o que é benéfico, pois a formação de gelo no interior da célula pode resultar em sua morte e, conseqüentemente, em reduzida fertilidade do sêmen. Os crioprotetores penetrantes também causam rearranjo dos lipídios e das proteínas da membrana, o que resulta em aumento da fluidez da membrana, maior desidratação a baixas temperaturas e, por conseguinte, maior capacidade para sobreviver à criopreservação (HOLT, 2000).

A concentração final do crioprotector no meio de congelamento varia, mas é determinado pela toxicidade da substância química e por seus efeitos benéficos sobre os espermatozoides. O glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o etilenoglicol são geralmente utilizados em uma concentração que varia entre 1 e 8% (TULI; HOLTZ, 1994; SINGH *et al.*, 1995; KUNDU *et al.*, 2000).

Kundu *et al.* (2000), trabalhando com sêmen de caprinos, observaram que a utilização de 6% de glicerol sozinho como crioprotetor resultou em maior porcentual de motilidade dos espermatozoides após criopreservação, quando comparado com sêmen congelado, utilizando o etilenoglicol ou o dimetilsulfóxido. A utilização de ambos, glicerol (6%) e o dimetilsulfóxido (5,9%), alcançou efeito sinérgico entre os crioprotetores. A motilidade média pós-descongelamento, utilizando glicerol ou DMSO, foi de 33 e 15%, respectivamente, enquanto a combinação desses crioprotetores resultou em 45% de espermatozoides com motilidade progressiva (KUNDU *et al.*, 2001).

Como alternativa, alguns pesquisadores vêm utilizando as amidas como crioprotetor penetrante. As amidas possuem um mecanismo de ação crioprotetor diferente do glicerol, devido à sua estrutura molecular e à sua

habilidade de permear a membrana celular. O mecanismo de ação das amidas é devido ao seu grupamento funcional amina, que contém nitrogênio, portanto é quimicamente distinto do grupamento funcional do glicerol, que são as hidroxilas. As amidas realizam ligações de hidrogênio com a molécula da água em três sítios de ligação. Além disso, devido ao menor peso molecular e à viscosidade das amidas em relação ao glicerol, elas possuem maior permeabilidade de membrana, diminuindo a possibilidade de danos celulares causados por estresse osmótico (BALL; VO, 2001). Por isto, supõe-se que as amidas possuam uma forma mais eficaz de realizar a coligação com a molécula da água, desempenhando um mecanismo crioprotetor celular mais eficiente que o glicerol (BALL; VO, 2001; KAROW, 2001). No entanto, a utilização dessas substâncias em diluentes para congelamento de sêmen caprino ainda está em fase inicial de experimentação.

Em experimento realizado por Silva *et al.* (2006) para congelamento de sêmen, foram testados três grupos experimentais, em que foram utilizados meios diluentes contendo 7% de glicerol, 3,5% de glicerol mais 3,5% de dimetilformamida e 5% de dimetilformamida. Os autores relatam que os valores de integridade de membrana plasmática, integridade acrossômica e reação acrossômica pós-descongelamento não diferiram entre os tratamentos, indicando que a dimetilformamida não foi superior ao glicerol na manutenção da qualidade espermática após a criopreservação. Contudo, mais estudos são necessários para que a utilização dessas substâncias seja recomendada na rotina de congelamento do sêmen caprino, sobretudo com relação à fertilidade do sêmen utilizado na inseminação artificial.

Alguns estudos têm concentrado suas atenções nos processos oxidativos que ocorrem na célula espermática durante os processos de criopreservação. Hoje, os protocolos de conservação do sêmen congelado envolvem diferentes etapas, que durante a sua execução levam à produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), dentre as quais se destacam o radical livre superóxido e o peróxido de hidrogênio. O ROS atua de maneiras diferentes sobre a membrana plasmática da célula espermática, levando à ocorrência da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, o ROS favorece o aumento da fragmentação do DNA, despolimerizando ácidos hialurônicos, modifica a estrutura do citoesqueleto e interfere na fusão dos

espermatozoides com o ovócito (OCHSENDORF, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002). No entanto, no que diz respeito aos estudos com relação aos efeitos sobre os espermatozoides caprinos, a literatura é bastante escassa.

O animal passa por processos estressantes ao seu organismo, por exemplo, processos de inflamatórios, isquemia, envelhecimento e carcinogêneses. Além disso, o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes favorece a formação de peróxidos, causando estresse oxidativo e consequentemente sequelas patológicas (OCHSENDORF, 1999).

A formação ou degradação das ROS é uma condição fisiológica inerente a todos os organismos aeróbicos, levando a concentrações normais necessárias para o funcionamento da célula, ou a quantidades excessivas, causando danos oxidativos à célula (NORDBERG; ARNER, 2001; IMAI; NAKAGAWA, 2003).

O efeito prejudicial das ROS no espermatozoide foi proposto há mais de cinco décadas, demonstrando que a exposição de espermatozoides de humanos a altas concentrações de oxigênio resultava em toxicidade, com diminuição acentuada da sua motilidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Na busca de minimizar os efeitos ROS na criopreservação do sêmen, alguns antioxidantes têm sido utilizados, entre eles algumas vitaminas e a própolis.

As vitaminas antioxidantes protegem as membranas plasmáticas, reagindo e removendo os radicais livres, assim destruindo os mecanismos de reação.

A vitamina C ou ácido ascórbico, ou ainda ascorbato, é uma vitamina hidrossolúvel com propriedade antioxidante. Ela reduz o  $\alpha$ -tocoferol, os peróxidos e as ROS, como superóxidos, e também age prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas e protegendo a célula dos danos oxidativos causados pelas ROS (NORDBERG; ARNER, 2001).

A própolis é um antioxidante coletado pelas abelhas, de diferentes partes de plantas. É um dos produtos naturais mais utilizado desde a Antiguidade, sendo administrado sob diversas formas (PEREIRA *et al.*, 2002).

As propriedades da própolis estão ligadas à sua composição química, sendo este inclusive um dos problemas em sua utilização, uma vez que a

composição química pode variar de acordo com o tipo de pasto onde as abelhas fazem a coleta, assim como com a espécie da abelha (PEREIRA *et al.*, 2002).

Os mesmo autores relatam que na composição química da própolis encontram-se: ácidos graxos, ácidos fenólicos e seus ésteres, flavanóides, terpenos,  $\beta$ -esteróides, aldeídos aromáticos e álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados do estilbeno. Também foi observada a presença de vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, E e PP, de minerais como Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr<sup>3-5</sup>, e mais recentemente, com a evolução das técnicas de análise, a presença de compostos de alta massa molecular e carboidratos como frutose, glicose, sacarose e maltose.

Em experimento realizado por Castilho (2008), na criopreservação do sêmen de caprinos, foram utilizados o ácido ascórbico e a própolis como antioxidantes, em duas concentrações, 0,05 e 0,25, 0,25 e 0,5%, respectivamente. O autor observou que o ácido ascórbico manteve a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides durante o processo de criopreservação, bem como sua viabilidade após o teste de termorresistência, podendo ser uma alternativa na composição de diluentes para criopreservação de sêmen caprino. A própolis não foi eficaz na manutenção da integridade e viabilidade espermática pós-descongelamento, mostrando ser tóxica aos espermatozoides nas concentrações de 0,25 e 0,5%.

## **2.6. Fisiologia reprodutiva da cabra**

Desde a sua domesticação há 9.000 anos no sudoeste da Ásia, os caprinos têm se espalhado por todos os continentes, distribuindo-se tanto em latitudes equatoriais, como árticas, e tanto em zonas úmidas, como áridas. Esta espécie animal, como várias outras, desenvolveu uma diversidade de estratégias reprodutivas para se adaptar às condições climáticas adversas. O objetivo primordial dessas estratégias foi assegurar a sobrevivência de sua prole, o que envolve a predição de condições nutricionais futuras, usando sinais ambientais, assim como as mudanças fotoperiódicas ou de temperatura (MARTIN *et al.*, 1999). No caso das raças originárias de regiões de clima temperado, a atividade sexual é limitada a uma determinada época do ano

(CHEMINEAU *et al.*, 1992b), enquanto as nativas de regiões de clima tropical apresentam um potencial biológico para se reproduzirem ao longo de todo o ano (SIMPLÍCIO *et al.*, 1986).

A estacionalidade reprodutiva é condicionada pelo fotoperíodo, o que faz com que os rebanhos caprinos apresentem sazonalidade na produção leiteira e na produção de carne. A influência do fotoperíodo é marcante tanto nos machos quanto nas fêmeas de raças oriundas do hemisfério norte, que iniciam seu ciclo reprodutivo anual em função da diminuição da intensidade de luz diária, marcadamente no outono, sendo considerados animais poliéstricos estacionais de “dias curtos” ou “fotoperíodo negativo”. Devido a esse fato biológico, a produção leiteira se concentra nos períodos de inverno, primavera e verão (de agosto a março na região centro-sul), quando gradativamente findam as lactações, que somente reiniciarão na próxima estação de parição, o inverno. Isso resulta em uma entressafra de aproximadamente quatro meses, o que acarreta severos problemas para produtores e consumidores. Métodos de indução do estro foram desenvolvidos e adaptados às nossas condições de fotoperíodo, permitindo redução da entressafra da produção de leite e de carne e, conseqüentemente, retorno uniforme de capital ao produtor.

De modo geral, a indução do estro pode ser obtida pelo uso de fotoperíodo artificial (CORDEIRO, 1992), efeito do macho (CARNEVALI *et al.*, 1997), uso de melatonina (DEVESON *et al.*, 1992) ou, ainda, por uma combinação de hormônios (FONSECA, 2002).

A cabra é classificada como poliéstrica estacional, ou seja, apresenta vários estros em estações determinadas. A duração do ciclo estral na cabra é, em média, de 21 dias, podendo variar de 17 a 25 dias (CHEMINEAU *et al.*, 1992b).

O estro é o período do ciclo estral no qual a fêmea aceita a monta pelo macho, que na espécie caprina tem duração média de  $31,2 \pm 4,8$  horas (CHEMINEAU *et al.*, 1992b). Este período é influenciado pela raça, pela idade, pela estação, pelo estado sanitário e nutricional do reprodutor e das matrizes, bem como pela presença do macho (GONZALEZ-STAGNARO; MADRID-BURY, 1982). As cabras Angorá apresentam duração de estro mais curta (22 horas) do que as raças leiteiras (PRETORIUS, 1973). O estro em caprinos é também de duração mais curta no início e no fim da estação de monta, na

presença do macho e na primeira estação de monta de fêmeas jovens (ESPESCHIT, 1998).

A ovulação na fêmea caprina, em geral, ocorre no terço final do estro (CAMP *et al.*, 1983). Chemineau *et al.* (1992b) descrevem que com o aumento na duração dos dias, o que ocorre na primavera e no verão em regiões de clima temperado, a fêmea caprina apresenta uma fase de inatividade sexual, caracterizada pela ausência de estro (anestro).

A atividade ovariana, e conseqüentemente a estral, está sob o controle do hipotálamo e da hipófise anterior. O primeiro sintetiza e secreta GnRH, que atinge a hipófise, seja por meio dos axônios neuronais e, ou, do sistema vascular-porta, estimulando a síntese e liberação das gonadotrofinas: hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (BARIL *et al.*, 1995).

A onda pré-ovulatória de LH, na cabra, começa cerca de 24 horas antes da ovulação (FREITAS *et al.*, 1996) e 9 horas após o início do estro (CHEMINEAU *et al.*, 1982), iniciando alterações críticas no folículo que afetam sua condição de órgão endócrino e resultam na liberação do oócito.

Com a ruptura do folículo e a liberação do oócito, inicia-se o processo de formação do corpo lúteo, que secretará progesterona, preparando o útero para uma possível gestação e mantendo uma retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário, impedindo o aumento da frequência da secreção pulsátil de FSH e LH. Caso não se efetue a fertilização, o corpo lúteo regride, permitindo a maturação de outros grandes folículos ovarianos. Isto ocorre devido à ausência de um embrião na parede endometrial uterina, implicando o estímulo de glândulas endometriais presentes no endométrio e na conseqüente liberação de prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>α</sub>).

A PGF<sub>2</sub>α, sintetizada e secretada pelo endométrio, é essencial para a luteólise em várias espécies, dentre as quais a caprina (FORD *et al.*, 1995). A concentração desta substância no plasma da veia uterina, durante a luteólise, é pulsátil, existindo de três a quatro pulsos para cada 24 horas (AULETTA; FLINT, 1988). A ocitocina estimula a secreção de PGF<sub>2</sub>α pelo útero e, em contrapartida, a PGF<sub>2</sub>α estimula a produção de ocitocina de origem lútea (NISWENDER; NETT, 1988). Com a produção de PGF<sub>2</sub>α ocorrem a luteólise e a conseqüente diminuição dos níveis séricos de progesterona, promovendo o

desbloqueio do eixo hipotalâmico-hipofisário, a secreção das gonadotrofinas (FSH e LH) e o reinício de um novo ciclo.

## **2.7. Nutrição e atividade reprodutiva**

A disponibilidade de nutrientes é um regulador fundamental da função reprodutiva da cabra, pois uma severa desnutrição é capaz de cessar toda a atividade reprodutiva em detrimento de outros fatores (RONDINA, 1998). Em raças caprinas não fotorresponsivas, como é o caso das cabras existentes na Região Nordeste do Brasil, a súbita disponibilidade de boa nutrição pode induzir ao estro e à ovulação, apesar de existir evidência de que o estímulo ovulatório pode ser a própria pluviosidade (GARCÍA, 1981). Em fêmeas cíclicas, o melhoramento da nutrição aumenta a taxa de ovulação e a incidência de nascimentos múltiplos, sem afetar a incidência de estros ou o comprimento do ciclo estral (HENNIAWATI; FLETCHER, 1986). Por outro lado, nas raças fotorresponsivas, os efeitos de mudanças nutricionais bruscas na atividade reprodutiva dependerão do tempo de inibição fotoperiódica sobre o eixo reprodutivo, por ocasião do manejo nutricional. Durante a estação de reprodução, o nível nutricional pode influenciar a proporção de cabras ovulando (MARTIN *et al.*, 1992), a prolificidade e o subsequente intervalo entre partos (GONÇALVES, 1996).

## **2.8. Atividade da glândula pineal**

Caprinos de raças europeias demonstram um forte padrão estacional de reprodução em latitudes temperadas, com um período obrigatório de anovulação e anestro (CHEMINEAU *et al.*, 1992b). Esta alternância entre atividade sexual e anestro é causada por um ritmo interno, que é regulado pelo fotoperíodo (MALPAUX *et al.*, 1989). Na Região Sudeste do Brasil, as cabras apresentam estacionalidade reprodutiva no período compreendido entre agosto e janeiro, o que resulta em produção de leite não uniforme ao longo do ano.

Os dados disponíveis sugerem que a ausência da atividade reprodutiva durante o anestro é o resultado de uma supressão da secreção de GnRH,

induzida por diversos sistemas neuronais inibitórios no hipotálamo (NAGY *et al.*, 2000).

Os sinais fotoperiódicos são traduzidos em efeitos no sistema reprodutivo através de alterações no padrão de secreção de melatonina, que é secretada pela glândula pineal, resultando em alterações na liberação pulsátil de GnRH pelo hipotálamo (MORI; OKAMURA, 1986). A melatonina ou N-acetil-5-metoxi-triptamina é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal dos vertebrados. Entre suas funções destacam-se regulação do sono, sinalização antiapoptótica, antioxidante, protetor celular, modulador do sistema imunológico e oncostática. A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, é liberada na corrente sanguínea em uma só passagem pelo fígado (metabolismo de passagem única), é conjugada e então eliminada, principalmente pela urina, na forma de 6-sulfomelatonina. A melatonina é secretada em um ritmo diário, ocorrendo picos durante as horas de escuridão. Nesse período, a norepinefrina é sintetizada e secretada pelos neurônios simpáticos pós-ganglionares, pertencentes ao gânglio cervical superior (NAGY *et al.*, 2000). A destruição da inervação simpática para a glândula pineal por gangliectomia cervical superior abole o padrão de secreção de melatonina, bem como as respostas ovulatórias e de prolactina ao fotoperíodo (MAEDA *et al.*, 1988).

## **2.9. Utilização de fotoperíodo artificial**

Na ausência de luz, a glândula pineal sintetiza e secreta melatonina, hormônio diretamente responsável pela atividade reprodutiva, que transmite informações relativas ao "ciclo luz-escuro" para a regulação fisiológica do animal, refletida em estacionalidade ou ciclicidade estral. A partir do solstício de inverno, cessa o estímulo dos dias curtos e, conseqüentemente, da melatonina no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovário. No hemisfério sul, a diferença de luminosidade entre estações do ano é menos marcante, atingindo uma diferença entre fotoperíodo mínimo (solstício de inverno) e máximo (solstício de verão) de aproximadamente 3 horas na Serra da Mantiqueira (TRALDI *et al.*, 2000), 4 horas em Porto Alegre e apenas 1 hora em Recife (OTO DE SÁ,

2002). No hemisfério norte a diferença é, em média, de 8 horas, o que justifica o fato de os animais de raças puras importadas e seus descendentes serem menos estacionais que em seus países ou continente de origem, e de apresentarem menor estacionalidade no Nordeste, comparativamente ao centro-sul do Brasil.

Dessa forma, as fêmeas de raças estacionais gradativamente entram em anestro, voltando a ciclar quando ocorre nova diminuição do fotoperíodo (CHEMINEAU *et al.*, 1996; MALPAUX *et al.*, 1996, THIMONIER, 1996). Por esse motivo, faz-se necessário promover uma quebra na estacionalidade reprodutiva, levando a duas épocas de parição por ano, uma no inverno e outra no final do verão e outono, que resultarão em produção leiteira uniforme e disponibilidade de oferta de carne caprina no inverno.

Pode-se, dessa forma, fornecer um suplemento de horas de luz para mimetizar os dias longos, com 16 horas de luz e 8 horas de escuro (16L: 8E) durante dois meses, com início no outono, devendo ser lembrado que os reprodutores têm de receber o mesmo número de horas de luz que as fêmeas (RODRIGUES *et al.*, 1994; TRALDI *et al.*, 2001), o que permite ao animal interpretar uma condição de primavera, tornando-o refratário aos dias curtos de outono e inverno.

Desde o início da década de 1990 o tratamento com a utilização de luz vem sendo usado por pesquisadores, técnicos de campo e criadores. Quando esse tratamento está associado ao efeito no macho no início da primavera, permite que cerca de 70 a 80 % das fêmeas tratadas apresentemaios férteis durante a primavera e as parições ocorram durante o outono do ano subsequente (CORDEIRO, 1991; RODRIGUES *et al.*, 1994; TRALDI *et al.*, 2001). Findo o tratamento o *timer* é desativado, e os animais retornam à situação de fotoperíodo natural. Passados 60 dias desencadeia-se a manifestação dos estros (TRALDI *et al.*, 2001), com resultados de fertilidade semelhantes aos da estação sexual fisiológica para a espécie (TRALDI *et al.*, 2000). É importante ressaltar que, da mesma forma como ocorre na estação reprodutiva, alguns animais apresentamaios curtos no início da estação de luz, vindo a normalizar logo nos próximosaios, sem nenhum prejuízo para a eficiência reprodutiva do rebanho (CHEMINEAU, 1989, MARTIN *et al.*, 2004). Este fato ocorre devido à formação de corpos lúteos de curta duração, que

regridem rapidamente, levando a ciclos curtos, porém a progesterona produzida pelos próximos corpos lúteos atua como *priming* que desencadeia novos ciclos ovulatórios, de duração e fertilidade normais.

Em experimento realizado por Traldi *et al.* (2000), utilizando 77 fêmeas da raça Saanen, com produção média de 4,5 kg/leite/dia, submetidas durante dois meses ao tratamento 16 L: 8E, foi observada uma taxa de prenhez de 53,8% em inseminação artificial e 88,9% em monta natural.

Assim como ocorre nas fêmeas, os machos sofrem influência do fotoperíodo (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000), tanto em quantidade (volume, concentração e número total de espermatozoides por ejaculado), quanto em qualidade (porcentual de espermatozoides móveis, porcentagem de espermatozoides anormais e motilidade progressiva). Os autores relatam que o sêmen de melhor qualidade é o produzido durante a estação reprodutiva fisiológica para a espécie, de acordo com a latitude em que os animais se encontram. No entanto, os efeitos da sazonalidade não são suficientes a ponto de prejudicar a utilização ou impedir a utilização dos reprodutores ao longo do ano. Todavia, diferenças individuais na quantidade e qualidade do sêmen entre os bodes devem ser observadas, a fim de realizar avaliações antes da época de cobertura.

## **2.10. Técnica de inseminação artificial via transcervical**

A inseminação artificial (IA) consiste na retirada ou coleta do sêmen do reprodutor e sua posterior deposição na genital da fêmea, por mecanismos físicos efetuados pelo homem. A coleta do sêmen pode ser feita através da vagina artificial ou eletroejaculador. O sêmen coletado pode ser utilizado na forma de fresco (diluído ou fracionado), resfriado ou congelado, o que permite a sua estocagem e o seu transporte (RIBEIRO, 1997). Gonçalves *et al.* (2001) afirmaram que a IA é a técnica mais importante para o melhoramento genético de animais, em função do melhor aproveitamento de reprodutores altamente selecionados. Ainda de acordo com os autores, a inseminação artificial permite programar os nascimentos para algumas épocas desejadas do ano.

Muitos fatores podem influenciar a eficiência dessa técnica, dentre eles: tipo de sêmen utilizado (fresco, refrigerado ou congelado), via de inseminação utilizada (transcervical ou laparoscópica), local de deposição do sêmen no

aparelho genital feminino (vagina, cérvix ou útero), número de inseminações, qualidade do sêmen, tipo de estro (natural ou induzido), horário de inseminação e habilidade do inseminador (EVANS; MAXWEL, 1987; CORTEEL *et al.*, 1988; NUNES, 2001).

Além da otimização de fertilização das fêmeas, a técnica da inseminação artificial ainda apresenta outras vantagens, como: teste do reprodutor, já que o sêmen pode ser transportado para várias propriedades, fertilizando um grande número de fêmeas, aumentando assim o número de informações de determinado macho. Desta forma, descartam-se os maus reprodutores e separam-se apenas aqueles geneticamente superiores; menor gasto com manutenção, alimentação e acomodações dos reprodutores; aumento da vida útil dos reprodutores, inclusive podendo ser utilizados por anos após a morte do macho, já que o material seminal pode ser armazenado por tempo indeterminado no botijão de nitrogênio líquido; controle de doenças transmissíveis no ato da cópula; programação das parições e produtividade; e possibilidade de utilizar reprodutores incapacitados para realizar a monta (ex.: problemas que impossibilitem o macho de ficar em pé ou sustentar-se no momento da cópula). Entretanto, vale a pena ressaltar alguns inconvenientes encontrados no uso dessa técnica, como: necessidade de mão-de-obra especializada; no caso de utilização de reprodutores não provados, pode ocorrer uma rápida disseminação de características indesejáveis sobre o rebanho; e custos iniciais elevados.

A principal vantagem do sêmen congelado é o aumento do potencial reprodutivo do reprodutor, chegando a ser imensurável, segundo Ribeiro (1997). O sêmen congelado apresenta limitações de seu uso em face deste processo comprometer a qualidade, reduzindo a concentração espermática por dose de sêmen. Nesse sentido, a deposição do sêmen o mais próximo possível do local de fecundação visa melhorar o índice de fertilidade. Embora em algumas cabras seja possível a deposição do sêmen diretamente no útero através da via transcervical, há animais em que isto só será possível mediante o uso da técnica laparoscópica (CHEMINEAU; COGNIÉ, 1991). Esta técnica é baseada no princípio de redução do espaço percorrido pelo espermatozoide desde a deposição no trato genital feminino até o sítio de fertilização.

Machado e Simplício (2001) apontaram como alternativa para melhorar os índices de fertilidade a observação visual dos sinais de estro, realizando a inseminação 12 a 15 horas após o início do estro; no entanto ela é considerada inviável para realização da inseminação laparoscópica, visto que se trata de um procedimento cirúrgico, e como tal deve ser realizado de maneira a torná-lo o mais inócuo possível. A realização desta técnica, de maneira intercalada, de acordo com a manifestação de estro dos animais, a tornaria mais dispendiosa e aumentaria os riscos de contaminação.

A inseminação artificial é a alternativa ideal quando ocorre a indução do estro, pois as fêmeas serão inseminadas em horários pré-fixados (IATF), simplificando o manejo e otimizando o método. Na raça Alpina poderá ser feita uma única inseminação  $42 \pm 2$  horas após a retirada do pessário vaginal (progestágeno), e  $45 \pm 2$  para a Saanen, com uma taxa de fertilidade de 60 a 65% (CORTEEL; LEBOEUF, 1990). A redução de 45 mg de FGA para 40 ou 20 mg do hormônio permitiu manter a sincronia quanto ao início da manifestação do estro (18 a 30 horas pós-retirada das esponjas), pico do LH (24 a 42 horas pós-retirada das esponjas) e taxas de gestação superiores a 60%, sem diferença entre tratamentos (LEBOEUF *et al.*, 2003), o que demonstra que doses inferiores de progestágeno podem ser usadas na indução do estro na contraestação reprodutiva.

Vários pesquisadores vêm tentando melhorar a eficácia reprodutiva da cabra, porém existe uma barreira natural denominada cérvix. A cérvix e seus anéis são constituídos de tecido cartilaginoso de consistência rígida, o que dificulta a passagem da pipeta inseminadora através dela. Outro entrave com relação à técnica é que, diferentemente dos bovinos, onde é possível manipular a cérvix via retal, o acesso à cérvix das cabras é unicamente via vaginal, o que para algumas pessoas menos habilidosas pode representar uma grande dificuldade. Quanto à taxa de concepção, Amoah e Gelaye (1997) relatam haver variação entre 50 e 70%, dependendo da época do ano, sendo os índices mais baixos fora da estação reprodutiva.

## **2.11. Muco cervical**

O volume, a aparência e a consistência do muco variam durante o período de estro. As alterações nas características do muco se devem à presença de células de descamação do epitélio do sistema genital feminino.

No início do estro o muco é cristalino e há pouca secreção; após 12-18 horas, ele se torna estriado e abundante; e com 25-30 horas do início do estro, torna-se denso e com aparência caseosa (EVANS; MAXWELL, 1987).

A observação do muco e da sua alteração durante o período de cio pode ser usada para estimar o melhor momento do estro para realizar a inseminação, uma vez que há correlação entre o tipo de muco observado no momento da inseminação e a taxa de fertilidade. Dessa forma, o melhor momento para realizar a inseminação é quando o muco se apresenta estriado e abundante (12-18 horas após o início do estro).

Taxas de parto de 76,2 e 86,4% foram observadas em cabras inseminadas quando o muco cervical apresentava-se com aspecto cristalino e estriado, respectivamente (FRANÇA, 1981).

No entanto, quando a inseminação é realizada na presença de muco com aspecto cristalino, recomenda-se uma segunda inseminação, 12 a 14 horas após a primeira (BONFERT, 1964, citado por SIMPLÍCIO, 1987).

## **2.12. Horário de inseminação**

Na espécie caprina, os espermatozoides, recém-ejaculados, sobrevivem no útero e oviduto por somente 10-12 horas. O tempo de sobrevivência do gameta feminino, após a ovulação, é de 12-24 horas. Se os espermatozoides ou o óvulo iniciarem seu processo de envelhecimento, a fertilização pode ser prejudicada ou, se acontecer, pode resultar em desenvolvimento do embrião de forma inadequada ou sua degeneração por completo (EVANS; MAXWELL, 1987).

O sucesso da fertilização depende do momento em que o sêmen foi depositado no útero da fêmea, em relação ao da ocorrência da ovulação.

Na espécie caprina, a ovulação ocorre no terço final do estro, aproximadamente 30-36 horas após seu início. Nas fêmeas que apresentam

estro de curta duração, a ovulação pode ocorrer após o seu término (SMITH, 1986).

O momento da ovulação pode também receber influência do tipo racial da cabra (PRASAD *et al.*, 1980). Dessa forma, os autores observaram que 100% das cabras da raça Barbari ovularam com 32 horas após o início do estro natural. Porém, em trabalho anterior, onde a mesma raça foi utilizada, todas as cabras observadas ovularam dentro de 36 horas do início do estro natural (PRASAD, 1979).

Jarosz *et al.* (1971) observaram ovulações mais tardias em cabras da raça Toggenburg, ocorrendo 4,3 dias após o início do estro, com duração de quatro dias. Prasad e Bhattacharyya (1979) observaram a ocorrência de ovulações entre 10 e 40 horas após o início do estro, em cabras nulíparas da raça Barbari.

Fonseca (2002) obteve uma taxa de gestação de 62,5% em cabras inseminadas após a ovulação. Os tempos mínimo e máximo observados do início do estro à ovulação foram de 8-36 horas e 5-28 horas para cabras das raças Alpina e Saanen, respectivamente, com uma média geral de  $17,6 \pm 10,7$  horas. A duração média do estro, neste estudo, foi de  $16,2 \pm 10,8$  horas.

Uma maior taxa de fertilidade (70%) foi obtida quando a inseminação foi realizada nas primeiras 12 horas do estro. A taxa de fertilidade diminuiu para 63% quando a inseminação foi realizada entre 12 – 24 horas do início do estro, enquanto as inseminações realizadas após 24 horas responderam por uma taxa de fertilidade de 47% (DAUZIER, 1956).

Segundo Dauzier (1966), a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen resfriado, em diferentes intervalos do início do cio natural, foi maior quando a inseminação foi realizada no início do período de estro.

Resultados de fertilidade variando de 60,7 a 87%, após uma única inseminação, realizada entre 12-24 horas após o início do estro natural, foram descritos por Dauzier (1966); Corteel (1971), França (1981) e Vivanco *et al.* (1982).

Utilizando sêmen congelado, Corteel (1971) observou melhor taxa de fertilidade (66,9%) quando a inseminação foi realizada 6-12 horas após o início do cio, diminuindo para 49% quando realizada com 36-48 horas.

Apesar de vasta literatura nacional e internacional a respeito da utilização do sêmen caprino, ainda não foram estabelecidos qual a melhor metodologia de processamento do sêmen resfriado e congelado, o diluidor ideal, a importância ou não do plasma seminal, o percentual de gema-de-ovo e qual a melhor concentração da dose inseminante e, com relação às fêmeas, qual o melhor momento para inseminação. Os resultados são conflitantes, e muitas vezes não há repetibilidade de resultados de uma mesma metodologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E. M.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm. In: AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram sêmen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v. 57, p.1801-1808, 2002.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 715-745, 1993.

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

AMOAH, E. A.; GELAYE, S. Biotechnological advances in goat reproduction. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 578-585, 1997.

ANCHORDOGUY, T. J.; RUDOLPH, A. S.; CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 324-331, 1987.

ARRUDA, R. P. de. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfologia (ASMA)**. 2000. 85 f. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

AULETA, F. J.; FLINT, A. P. F. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, non human primates and women, specially in relation to the time of luteolysis. **Endocrine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 88-105, 1988.

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

BALL, B. A., VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. Características de la reproducción en ovinos y caprinos. **Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras**. FAO, v. 115, p. 3-12, 1995.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-410, 1997.

BOYD, E. N.; PERKINS, J. R. OLDS, D. The longevity of bovine spermatozoa in chemical and heat-treated pasteurized milk. **J. Dairy Sci.**, v. 37, p. 650, 1954.

CAMP, J. C. ; WILD, D. E. ; HOWARD, P. K.; STUART, L. D.; CHAKRABORTY, P. K. Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. **Biol. Reprod.**, v. 28, p. 673-681, 1983.

CARNEVALI, F.; SCHINO, G.; DIVERIO, S. et al. Oestrus induction and synchronization during anoestrus in cashmere goats using hormonal treatment in association with "male effect". **Europ. Fine Fibre Net.**, v. 6, p. 55-63, 1997.

CASTILHO, E. F. **Uso da propólis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008, 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991. p. 115-161.

CHEMINEAU, P.; GAUTHIER, D.; POIRIER, J. C. *et al.* Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol 17B and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. **Theriogenology**, v. 17, ri. 3, p. 313-323, 1982.

CHEMINEAU, P.; L'effect bouc: mode d'action et efficacité pour stimuler la reproduction des chèvres en anoestrus. **INRA Prod Anim**, v. 2, p. 97-104, 1989.

CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; DELGADILLO, J. A. *et al.* Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 30, p. 157-184, 1992b.

CHEMINEAU, P.; NORMANT, E.; RAVAUULT, J. P.; THIMONIER, J. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. **Journal Reprod. Fertil.**, v. 78, p. 497-504, 1986.

CORDEIRO, P. R. C. Birth synchronization in goat's milk herd without hormone use. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 24., 1991. Rio de Janeiro-RJ. **Proceedings...** Rio de Janeiro: AMV, 1991. 7 p.

CORDEIRO, P. R. C. Sincronização de cio em cabras leiteiras com fotoperiodismo artificial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 22., 1992, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Sociedade Goiana de Veterinária, 1992. p. 22-25.

CORTEEL, J. M. Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma, glucose effect. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v. 14, p. 741-745, 1974.

CORTEEL, J. M.; LEBOEUF, B. Évolution techno-économique de l'insemination artificielle caprine. **Elev Ins**, v. 237, p. 3-17, 1990.

CORTEEL, J. M.; LEBOEUF, B.; BARIL, G. Artificial breeding of adult goat and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. **Small Ruminant Research**, v. 1, p. 19-35, 1988.

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

CRUZ, J. F. **Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido à temperatura de +4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água-de-coco.** Fortaleza, 1994. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 1994.

DAUZIER, L. Artificial insemination in the goat. In: DALLING (Ed.). **Int. Encyclopedia of Veterinary Medicine.** W. Green and Soon, 1966. p. 269-271.

DAUZIER, L. Quelques resultants sur l'insémination artificielle des brebis et des chèvres en France. In: PROCEEDINGS OF 3<sup>rd</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, Cambridge, v. 3, p. 12-14, 1956.

De LEEUW, F. E.; De LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J. H. G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

DEVESON, S. L.; FORSYTH, I. A.; ARENDT, J. Induced out-of-season breeding in British Saanen dairy goats: use of artificial photoperiods and/or melatonin administration. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 29, p. 1-15, 1992.

ESPESCHIT, C. J. B. Alternativas para controle da estacionalidade reprodutiva de cabras leiteiras. In: PROCEEDINGS OF V ENDEC, Belo Horizonte, 1998. p. 7-33.

EVANS, G.; MAXWEL, W. M. C. Artificial insemination of sheep and goats. **Butterworth Publishers**, v. 53, n. 4, p. 25-29, 1987.

FASTAD, W. Sêmen cryopreservation in dogs and foxes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 251-260, 1996.

FERNANDEZ-ABELLA, D.; PREVE, M. O.; VILLEGAS, N. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram sêmen affects fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 21-26, 2003.

FONSECA, J. F. **Controle e perfil hormonal do ciclo estral e performance reprodutiva de cabras alpina e saanen**. 2002. 107 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>>. Acesso em: 2 Nov. 2005.

FORD, M. M.; YOUNG, I. R.; THORBURN, G. D. Prostaglandins and the maintenance of pregnancy in goats. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 49, p. 555-559, 1995.

FRANÇA, M. P. **Inseminação artificial com sêmen congelado de caprino no sertão do estado de Pernambuco**. 1981. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 1981.

FREITAS, V. J. F.; BARIL, G.; BOSE, M.; SAUMANDE, J. The influence of ovarian status on response to estrus synchronization treatment in dairy goats during the breeding season. **Theriogenology**, v. 45, p. 1561-1567, 1996.

GARCÍA, O. **Genetic analysis of a crossbreeding experiment using improved dairy goat breeds and native goats in a dry tropical environment**. Ph.D. Thesis. Davis: University of California, 1981. 240 p.

GONÇALVES, H. C. **Fatores genéticos e de meio em algumas características produtivas e reprodutivas de caprinos**. 1996. 142 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1996.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. Biotécnica aplicada à reprodução animal. **Varela**, São Paulo, v. 15, n. 23, p. 57-65, 2001.

GONZALEZ-STAGNARO, C.; MADRID-BURY, N. Sexual season and oestrus cycle of native goats in tropical zone of Venezuela. In: PROCEEDINGS OF 111 INTERNATIONAL CONFERENCE GOAT PRODUCTION DISEASE, Tucson, 1982. p. 311.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North. Am.**, v. 12, p. 131-147, 1996. (Equine practice).

HAENLEIN, G. F. W. Past, Present, and Future Perspectives of Small Ruminant Dairy Research. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 2097-2115, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: New York, 1999. 936 p.

HENNIAWAT; FLETCHER, I. C. Reproduction in Indonesian sheep and goats at Mo level of nutrition. **Animal Reproduction Science**, v. 12, n. 2, p. 77-84, 1986.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of sêmen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-23, 2000.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.

JAROSZ, S. J.; DEANS, R. J.; DUKELOW, W. R. The reproductive cycle of the African Pygmy and Toggenburg goat. **J. Reprod. Fert.**, v. 24, p. 119-123, 1971.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the sêmen of Alpine Saanen and Damasco goat bucks born and raised in Greece. **Small Rum. Res.**, v. 37, p. 125-130, 2000.

KAROW, A. M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Augusta, Georgia, USA, 2001 (Xytex Corporation). Disponível em: <<http://www.xytex.com/Cryobiology>>. Acesso em: 14 Out. 2008.

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

KUNDU, C.N., CHAKRABORTY, J., DUTTA, P., BHATTACHARYYA, D., GHOSH, A., MAJUMDER, G.C., Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, p. 117-125, 2000.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Reproduction**, v. 123, p. 907-913. 2002.

KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUMDER, G. C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using chemically defined model system. **Cryobiology**, v. 41, p. 21-27, 2001.

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, Ph.; BATELLIER, F. *et al.* Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh sêmen. **Theriogenology**, v. 60, p. 867-877, 2003.

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

LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported sêmen. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 38., 1992, Orlando: AAEP, 1992. p. 629-647.

MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesq. Agropec. Bras.**, jan., v.36, n.1, p. 171-178, 2001.

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

MAEDA, K.; MORI, Y; KANO, Y. Involvement of melatonin in the seasonal changes of the gonadal function and prolactin secretion in female goats. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 28, n. 2, p. 487-497, 1988

MALPAUX, B.; ROBINSON, J. E.; WAYNE, N. L. *et al.* Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. **Journal of Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 269-278, 1989.

MARTIN, G. B.; RODGER, J.; BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. **Reprod Fert Dev**, v. 16, p. 491-501, 2004.

MARTIN, G. B.; BOUKHLIQ R.; TJONDRONEGORO, S. *et al.* The effects of nutrition on reproductive endocrinology. **Proceedings of Nutrition Society of Australia**, v. 17, p. 177-185, 1992.

MARTIN, G. B.; TJONDRONEGORO, S.; BOUKHLIQ, R. *et al.* Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, p. 355-366, 1999.

MAULPAUX, B.; VIGUIÉ, C.; THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P. Contrôle photopériodique de la reproduction. **INRA Prod. Anim.**, v. 9, p. 9-23, 1996.

MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Austr. Equine Vet. J.**, v. 14, p. 146-175, 1996.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

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

MORI, Y.; OKAMURA, H. Effects of timed melatonin infusion on prolactin secretion in pineal denervated goat. **Journal of Pineal Research**, v. 3, ri. 1, p. 77-86, 1986.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a new method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAIELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 245-262, 2000.

NISWENDER, G. D.; NETT, A. The corpus luteum and its control. In: **The Physiology of Reproduction**. 1. ed. New York: Raven, 1988, p. 486-526.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NUNES, J. F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1986, Niterói. **Anais...** Niterói, 1986.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y.; PRYSCILA, L. **Utilisation d'une substance activa "JYP" présents dans l'eau de coco pour la conservation "in vitro" et la fertilité des spermatozoïdes de mammifères.** S.l.: Sn., 1994.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água-de-coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, Fortaleza, v. 1, p. 17-26, 1999.

NUNES, J. F. Inseminação Artificial em Caprinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela Editora e Livraria, v. 7, p. 111-125, 2001.

OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reative oxygen species. **Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 399-420, 1999.

OTTO DE SÁ, C. Manejo reprodutivo para intervalo entre partos de oito meses. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA, 6., 2002. Botucatu-SP. **Anais...** Botucatu-SP: UNESP, 2002. p. 8-20.

PALOMINO, T. L.; CAMACHO, S. J.; FALCÓN, P. N. Conservación de sêmen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema. **Rev. Inv. Vet. Perú.** Disponível em: <<http://www.google/sêmen.com.br>>. Acesso em: 17 Dez. 2008.

PARKS, J.E; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209- 222, 1992.

PELLICER, M. T. **Purificación y caracterización del componente de la secreción bulbouretral de macho cabrio implicado en el deterioro de la cálida de los espermatozoides diluidos en leche.** In: Tesina de Licenciatura. Universidad de Murcia, 1995. 200 p.

PEREIRA, S. A.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, 2002.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A., A yolk–buffer pabulum for preservation of bull sperm. **J. Dairy Sci.**, v. 23, p. 399-404, 1940.

PICKET, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of sêmen. In: McKINNON, A. O. e VOSS, S. L. (Ed.) **Equine reproduction.** Malvern: Lea e Febiger, p. 746-754, 1993.

PRASAD, S. P. A note on the occurrence of short oestrous cycles and possible association of ovarion activity in Barbari nannies. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 49, n. 10, p. 854-856, 1979.

PRASAD, S. P.; BHATTACHARYYA, M. K. Oestrus cycle and behaviour in different seasons in Barbari nannies. **Indian Journal Animal Science**, v. 49, n. 12, p. 1058-1062, 1979.

PRETORIUS, P. S. Cyclic reproductive activity in the Angora **Agroanimalia**, v. 5, n. 3, p. 55-58, 1973.

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

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura**: criação racional de caprinos. São Paulo-SP: Nobel, 1997. 380 p.

RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J. Artificial insemination of cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, p. 377-384, 1990a.

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

RODRIGUES, M. H.; FONSECA, F. A.; ESPESCHIST, C. J. B.; RODRIGUES, M. T. Efeito da manipulação do fotoperíodo na indução de estro em cabras leiteiras mestiças. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 23, n. 6, p. 909-915, 1994.

RONDINA, D. **Effect of nutritional state on quantitative and qualitative development of ovarian preantral follicles in does SRD (*Capra hircus* L.)**. 81 p. 1998. Ph.D. (Thesis) – University of Florence, 1988.

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

SEIDEL, G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: **THECNQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS**, 1996, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: Colorado State University, 1996. p. 6-16.

SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; NASCIMENTO, V. A. Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia/Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.

SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial na espécie caprina. **Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, v. 13, p. 148, 1987.

SIMPLÍCIO, A. A.; RIERA, G. S.; NUNES, J. F. *et al.* Frequency and duration of estrous cycle and period in genetically nondescript (SRD) type of goats in the tropical Northeast of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 5, p. 535-540, 1986.

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. **Science**, v. 175, p. 720-31, 1972.

SINGH, M. P.; SINHA, A. K.; SINGH, B. K. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 1047-1053, 1995.

SMITH, A. H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v. 166, p. 668-671, 1950.

SMITH, M. C. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**, v. 2, 1986.

SOUZA, I. M.; MIES FILHO, A. Congelação do sêmen de bode. Efeito de duas soluções de lavagem. **A Hora Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 53-58, 1986.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. L.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. (Apostila).

STRYER, L. Biochemistry. In: FREEMAN, W. H. (Ed.). **Introduction to biological membranes**. 3. ed. New York, 1988. p. 283-310.

THACKER, D. L.; FLIPSE, R. J.; ALMIQUIST, J. O. Diluters for bovine sêmen. II. Effect of milk proteins upon spermatozoa liviability. **J. Dairy Sci.**, v. 37, p. 220, 1954.

THIMONIER, J. Photopériode et reproduction. **INRA Prod. Anim.**, v. 9, p. 3-8, 1996.

TRALDI, A. S. Controle farmacológico do ciclo estral e da superovulação em Caprinos e Ovinos. In: BARUSELLI, P. *et al.* **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000. p. 306-332.

TRALDI, A. S. Técnicas para otimizar o desempenho reprodutivo de cabras leiteira. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba-SP: FEALQ, 2001. p. 474-83.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, p. 547-555, 1994.

VIVANCO, W.; MORALES, C. ; NOLTE, E. Comparasion between artificial insemination with frozen sêmen and natural mating in Criollo goats in the North Coast of Peru under range conditions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, Arizona, 1982. p. 537.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **J. Reprod. Fert.** v. 62, p. 483-492, 1981.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the preservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility of Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

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.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-585, 2000.

## **Características e taxa de fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5°C por 24 horas, em função das concentrações de gema-de-ovo no diluente**

**Resumo:** O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Reprodução de Caprinos do Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Zona da Mata, no município de Viçosa-MG, durante a estação reprodutiva fisiológica (março a junho). O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, quais as concentrações de gema-de-ovo (Tratamento 1 – T1 = 20% ou Tratamento 2 – T2 = 2,5%) preservam melhor o sêmen caprino armazenado a 5°C, por 24 horas, em diluente citrato-gema-de-ovo. Os valores médios obtidos para o sêmen fresco quanto a volume (mL), motilidade (%), vigor (1-5), concentração espermática ( $\times 10^9$  totais), teste hiposmótico (%) e coloração supravital (%) foram de  $0,7 \pm 0,3$ ,  $87,9 \pm 3,3$ ,  $3,9 \pm 0,3$ ,  $1,3 \pm 0,6$ ,  $72,7 \pm 7,8$  e  $78,2 \pm 9,3$ , respectivamente. Os valores médios referentes ao sêmen resfriado mediante os tratamentos foram, respectivamente, para T1 e T2 de: motilidade,  $68,5 \pm 15,4$  e  $78,0 \pm 5,5$  ( $p < 0,05$ ); vigor,  $2,5 \pm 0,6$  e  $3,2 \pm 0,3$  ( $p < 0,05$ ); supravital,  $59,4 \pm 17,2$  e  $71,1 \pm 10,5$  ( $p < 0,05$ ) e hiposmótico,  $42,2 \pm 15,7$  e  $56,2 \pm 11,5$  ( $p < 0,05$ ). As taxas de fertilidade obtidas foram de 31,2% (T1) e 66,6% (T2) ( $p < 0,05$ ) e a prolificidade foi de  $1,3 \pm 0,5$  (T1) e  $1,4 \pm 0,5$  (T2) ( $p < 0,05$ ). De acordo com os resultados obtidos, pode-se recomendar a utilização do diluidor citrato-gema-de-ovo com baixa concentração de gema (2,5%) no seu volume total.

**Palavras-chave:** caprinos; sêmen; resfriamento; gema-de-ovo; fertilidade.

## Fertility of goat semen stored at 5°C for 24 hours in two different egg-yolk concentrations in the semen extender

**Abstract:** The experiment was carried through in Goat Reproduction Laboratory dependences of Caprine Sector, of Animal Science Department of Federal University of Viçosa, Mata Zone, Viçosa-MG, during physiological reproductive period (March to June). The objective of this work was evaluate, by *in vitro* and *in vivo* tests, which egg yolk concentrations (Treatment 1 (T1) = 20% or Treatment 2 (T2) = 2.5%) preserve better the goat semen stored at 5°C for 24 hours in citrate-egg yolk extender. The average values for fresh semen to volume (mL), motility (%), vigor (1-5), spermatic concentration ( $\times 10^9$  total), hypoosmotic test (%) and supravital coloration (%) were:  $0.7 \pm 0.3$ ;  $87.9 \pm 3.3$ ;  $3.9 \pm 0.3$ ;  $1.3 \pm 0.6$ ;  $72.7 \pm 7.8$  and  $78.2 \pm 9.3$ , respectively. The average values of cooled semen with T1 and T2 were respectively: motility,  $68.5 \pm 15.4$  ( $p < 0.05$ ) and  $78.0 \pm 5.5$  ( $p < 0.05$ ); vigor,  $2.5 \pm 0.6$  ( $p < 0.05$ ) and  $3.2 \pm 0.3$  ( $p < 0.05$ ); supravital test,  $59.4 \pm 17.2$  and  $71.1 \pm 10.5$  ( $p < 0.05$ ); and hypoosmotic test,  $42.2 \pm 15.7$  and  $56.2 \pm 11.5$  ( $p < 0.05$ ). The pregnancy rate was higher from treatment 2 than treatment 1 ( $p < 0.05$ ), 66.67% and 31.25%, respectively. The prolificity obtained was was of  $1.33 \pm 0.50$  (T1) and  $1.44 \pm 0.51$  (T2). In conclusion, can be recommend the use of low egg yolk concentration (2.5%) in citrate egg yolk goat extender.

**Keywords:** goat; semen; cooling; egg yolk; fertility.

## 1. Introdução

No Brasil, a utilização da inseminação artificial (IA) na espécie caprina ainda é limitada, em comparação a outras espécies, como a bovina, restringindo-se basicamente a trabalhos de pesquisa (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995).

Há de se considerar a baixa disponibilidade de sêmen e de reprodutores submetidos aos testes de progênie, a falta de estrutura para comercialização e transporte adequado do sêmen e, principalmente, as dificuldades no processo de sua preservação sob a forma congelada, com resultados insatisfatórios nos índices de concepção (RITAR; SALAMON, 1983; KARATZAS *et al.*, 1997).

Por outro lado, o elevado preço de compra e manutenção de um reprodutor caprino, as restrições envolvendo a importação de animais e de sêmen congelado, o elevado dano causado às células espermáticas no congelamento e, conseqüentemente, a baixa viabilidade espermática (SINGH; PURBEY, 1996; LEBOEUF *et al.*, 2000) são fatores que justificam a difusão do resfriamento do sêmen caprino. Além disso, a viabilidade do sêmen caprino resfriado e armazenado facilita o transporte do material genético entre propriedades. Roca *et al.* (1997), ao utilizarem sêmen resfriado a 5°C, por até 36 horas, obtiveram taxa de concepção de 73,5%.

A gema-de-ovo é comumente utilizada na maioria dos diluentes de sêmen de mamíferos e é empregada junto aos diluentes em concentrações que variam de 10 a 20%. Ela confere proteção às células espermáticas devido à presença da lecitina, seu componente fosfolipídico, que ela fornece à membrana da célula. A quantidade extra dessa substância favorece a estabilidade da membrana celular contra o choque térmico durante o processo de resfriamento e congelamento (WATSON, 1995). 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 (HOLT, 2000).

Os caprinos possuem a peculiaridade de secretar, juntamente com o líquido proveniente das glândulas bulbouretrais, uma enzima (enzima coaguladora da gema-de-ovo) que, em contato com a gema-de-ovo presente na maioria dos diluentes, produz toxicidade aos espermatozoides (IRITANI;

NISHIKAWA, 1961, 1963). Como possível solução desse problema, Ritar e Salamon (1982) propuseram utilizar no diluente 1,5% de gema-de-ovo na sua concentração final, enquanto Tuli e Holtz (1992) utilizaram 16,8%. Já Evans e Maxwell (1987) recomendaram 2,5% no total do volume do diluente.

Bispo (2005) avaliou, *in vitro*, o sêmen caprino diluído em citrato-gema-de-ovo em duas concentrações de gema (2,5 e 20%) e resfriado a 5°C durante 48 horas. Ao final desse período, o diluente contendo baixa concentração de gema-de-ovo (2,5%) foi o que melhor preservou o sêmen durante as 48 horas de armazenamento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e de fertilidade *in vivo*, quais as concentrações de gema-de-ovo (2,5% ou 20%) no diluidor citrato gema (MIES FILHO, 1987) preservam melhor o sêmen caprino armazenado a 5°C, por 24 horas.

## **2. Material e Métodos**

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Reprodução de Caprinos do Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, durante a estação reprodutiva fisiológica (março a junho de 2007), situado na Região-II do Estado de Minas Gerais, Brasil, correspondente à Zona da Mata, no município de Viçosa, a 20°45'20" latitude S e 42°52'40" W Gr, altitude média de 752,5m, temperatura média anual de 20,9°C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso) pela classificação de Köppen.

Os animais receberam alimentação volumosa composta de silagem de milho, concentrado proteico e mistura mineral que atendeu às exigências nutricionais das seguintes categorias: reprodutores, fêmeas em lactação e fêmeas solteiras. O controle sanitário dos animais foi realizado periodicamente, conforme o esquema preestabelecido pelo setor de Caprinocultura da UFV.

Foram utilizados quatro reprodutores caprinos adultos das raças Alpina (dois) e Saanen (dois), mantidos em baias individuais, apresentando fertilidade em estações reprodutivas anteriores, submetidos ao exame andrológico e aprovados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

Foram utilizadas 68 fêmeas em idade reprodutiva das raças Saanen e Alpina, tendo 32 fêmeas recebido o sêmen do tratamento 1 (T1 – 20% de gema-de-ovo) e 36 recebido o sêmen do tratamento 2 (T2 – 2,5% de gema-de-ovo). Todas as cabras foram inseminadas com sêmen armazenado a 5°C, por 24 horas.

As coletas de sêmen foram realizadas todos os dias, sendo dois reprodutores no período da manhã e dois à tarde, um de cada raça, de modo que a cada 12 horas sempre tivessem no banco de sêmen doses com 24 horas de armazenamento disponíveis para a realização das inseminações. O método de coleta foi o da vagina artificial, de acordo com Memon *et al.* (1986). Após a coleta foram realizadas as avaliações microscópicas quanto ao aspecto físico (motilidade e vigor), realizadas por dois técnicos (duplo cego) e, à coloração supravital com eosina-nigrosina, e o teste hiposmótico (HO) (FONSECA *et al.*, 2001).

A coloração supravital avalia a integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides, classificando-os em vivos (os que não se coram) e mortos (corados de rosa-claro ou de coloração avermelhada) (SMITH e MURRY, 1997). Para tanto, amostras de 10 µL do sêmen fresco ou resfriado foram adicionadas na proporção de 1:1 com solução de eosina-nigrosina em lâmina previamente aquecida a 37°C. Após 30 segundos, foi feito o esfregaço e avaliou-se a porcentagem de espermatozoides vivos com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 40X (SWANSON e BEARDEN, 1951).

Para realização do teste hiposmótico, foi seguida a metodologia descrita por Fonseca *et al.* (2001). Uma alíquota de 10 µL das amostras de sêmen fresco ou resfriado foi adicionada a 1 mL de solução hiposmótica (100 mOsm). Após a homogeneização, a amostra permaneceu incubada em banho-maria a 37°C, durante 1 hora. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em 0,5 mL de solução de formol salina tamponada, para sua fixação. Para a leitura das amostras de cada tratamento, 10 µL da mistura foram colocados entre a lâmina e a lamínula, analisados em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1.250X e avaliados, sendo contados 200 espermatozoides por lâmina.

Após a avaliação física, o sêmen foi dividido em dois volumes iguais e, em seguida, cada alíquota foi diluída na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor), de acordo com o tratamento proposto (T1 ou T2).

As concentrações espermáticas de cada alíquota foram determinadas com o auxílio de câmara de Neubauer e completando-se com o volume de diluidor necessário para a concentração final de  $200 \times 10^6$  de espermatozoides por mL, de acordo com o tratamento. O sêmen foi acondicionado em palhetas de 0,5 mL, resultando em  $100 \times 10^6$  de espermatozoides totais/dose inseminante.

Após o envase, as palhetas contendo seus respectivos tratamentos foram resfriadas, utilizando a curva de resfriamento (BISPO, 2005). As palhetas com o sêmen foram colocadas em um tubo de ensaio de 20 mL, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo de ensaio revestido por um refil (saco plástico) foi colocado dentro de um recipiente de plástico de aproximadamente 240 mL, contendo 120 mL de álcool absoluto. O recipiente com as palhetas foi então colocado na posição horizontal dentro da geladeira. Decorridos 35 minutos do início do resfriamento, o tubo de ensaio que continha as palhetas foi retirado do recipiente plástico e mantido à temperatura de geladeira por mais 25 minutos, perfazendo um tempo total de resfriamento de 60 minutos. Daí em diante, o sêmen permaneceu na geladeira a 5°C, até a sua utilização.

Após 24 horas de armazenamento a 5°C, o sêmen foi avaliado *in vitro* e procedidas as inseminações das cabras que foram detectadas em estro 12 horas antes. As rufiações foram realizadas duas vezes ao dia (às 6 e às 18 horas), com o auxílio de macho com translocação peniana cirúrgica, com libido comprovada.

### **Tratamento 1**

Diluidor citrato-gema (MIES FILHO, 1987), 20% de gema-de-ovo

Citrato de sódio mono-hidratado	2,9 g
Gema-de-ovo	20,0 mL
Penicilina	$1 \times 10^6$ UI
Estreptomicina	1,0 g
Água bidestilada (q.s.p.)	100 ml
Osmolaridade:	423 mOsm/kg

## Tratamento 2

Diluidor citrato-gema (MIES FILHO, 1987), modificado em 2,5% de gema-de-ovo (BISPO, 2005)

Citrato de sódio mono-hidratado	2,9 g
Gema-de-ovo	2,5 mL
Penicilina	1x10 <sup>6</sup> UI
Estreptomicina	1,0 g
Água bidestilada (q.s.p.)	100 ml
Osmolaridade:	412 mOsm/kg

O diluente citrato-gema foi eleito por ter sido testado *in vitro* em experimento anterior (BISPO, 2005) e ter tido bom resultado no armazenamento do sêmen caprino, porém a concentração de gema-de-ovo foi de 20%, como relatado originalmente por Mies Filho (1987). Esse diluente também apresenta fácil confecção e baixo custo.

As inseminações foram realizadas, utilizando-se preferencialmente a via transcervical (MIES FILHO, 1987). Neste procedimento foi utilizado aplicador universal para caprinos (Minitube) e a bainha de revestimento (Minitube) foi a de ponta excêntrica). Antes da realização da inseminação artificial, cada animal foi pesado e avaliado quanto ao escore de condição corporal (1 - 5). O rufião foi levado à presença das fêmeas a cada 12 horas, a fim de detectar o início do estro, caracterizado pela aceitação da monta por essas fêmeas. As rufiações ocorreram até a fêmea não mais aceitar a monta, a fim de quantificar a sua duração. As inseminações foram feitas 12 horas após a detecção do estro.

As inseminações foram feitas, colocando-se a fêmea de cabeça para baixo e apoiada sobre um cavalete apropriado, facilitando, desta forma, o posicionamento do genital feminino para realização das inseminações. Com o auxílio de um espécuro tipo bico de pato e de uma fonte de luz, foram visualizados a entrada da cérvix e o aspecto do muco. O tempo para realização das inseminações não ultrapassou 1,5 minuto.

O aspecto do muco cervical foi classificado como 1 - cristalino, 2 - estriado e 3 - caseoso (EVANS; MAXWELL, 1987).

Logo após a inseminação foi anotado o local de deposição do sêmen, em que 1 = cervical superficial; 2 = cervical; e 3 = Intrauterino.

O diagnóstico de gestação foi efetuado aos 30 dias pós-inseminação, com o auxílio de aparelho ultrassonográfico equipado com transdutor linear de 5,0 MHz, por via transretal. Na ocasião foi também realizada a quantificação fetal, para posterior quantificação da prolificidade.

Análise estatística: os dados paramétricos, referentes à qualidade do sêmen, como motilidade, vigor, reação ao teste hiposmótico (HO), número de espermatozoides vivos e mortos (supravital), foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste SNK, utilizando-se o programa SAEG 9.0 (UFV, 2005). Os dados qualitativos não paramétricos (taxa de gestação) foram testados pelo teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) (AYRES *et al.*, 2000).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Sêmen fresco

Os dados referentes às características físicas e qualitativas do sêmen fresco estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios e desvio-padrão para características físicas e qualitativas do sêmen fresco de bodes das raças Saanen e Alpina, criados em manejo intensivo

Bode (n)	Volume (mL)	Motilidade (0-100%)	Vigor (0-5)	Espermatozoides Totais ( $\times 10^9$ )	Hiposmótico (%)	Supravital (%)
1 (23)	0,8 $\pm$ 0,2a	88,4 $\pm$ 2,7ab	3,9 $\pm$ 0,3a	1,6 $\pm$ 0,8a	76,3 $\pm$ 8,0a	74,6 $\pm$ 7,4c
2 (23)	0,8 $\pm$ 0,3ab	87,8 $\pm$ 2,9ab	4,0 $\pm$ 0,3a	1,3 $\pm$ 0,6a	74,6 $\pm$ 7,4a	69,5 $\pm$ 5,6d
3 (22)	0,7 $\pm$ 0,2ab	86,3 $\pm$ 3,5b	3,8 $\pm$ 0,3a	1,1 $\pm$ 0,5a	67,7 $\pm$ 7,1b	82,2 $\pm$ 7,1b
4 (22)	0,6 $\pm$ 0,2b	89,0 $\pm$ 3,6a	4,0 $\pm$ 0,3a	1,2 $\pm$ 0,5a	72,1 $\pm$ 6,4ab	87,0 $\pm$ 5,9a
Média $\pm$ S	0,7 $\pm$ 0,3	87,9 $\pm$ 3,3	3,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,6	72,7 $\pm$ 7,8	78,2 $\pm$ 9,3

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste SNK.

Quanto ao volume, os valores médios observados para os bodes 3 e 4 encontraram-se abaixo dos valores recomendados pelo CBRA (1998), que são de no mínimo 0,8 mL. No entanto, isto pode ser explicado pelo fato de os animais apresentarem uma idade mais avançada (em média 8 anos) em relação aos demais. Apesar de os valores médios para volume serem um

pouco inferior aos preconizados, a motilidade obtida para os quatro animais apresentou-se dentro dos padrões aceitáveis, em que foram encontrados valores médios de 87,9%. Da mesma forma, o vigor espermático apresentou valores médios de 3,9; o valor mínimo preconizado é de 3.

Os valores encontrados para concentração espermática estão abaixo dos valores recomendados pelo CBRA (1998), para todos os animais, em que se observou média de  $1,3 \times 10^9$  espermatozoides totais. As baixas concentrações espermáticas podem ser devido à mesma situação relatada em relação ao volume.

O teste hiposmótico aplicado às amostras de sêmen fresco revelou resultados médios para dobramento de cauda dos espermatozoides de 72,78% e motilidade média de 87,94%. Os valores encontrados foram superiores aos obtidos por Bittencourt *et al.* (2005), com valores médios de 53,9%, no entanto a motilidade espermática encontrada foi de 86%. Santos *et al.* (2006) relataram 82,72% de motilidade espermática e espermatozoides reativos ao teste hiposmótico de 51,97%. Castilho (2008) registrou 90,4% de motilidade espermática, em que 70,2% dos espermatozoides no sêmen fresco de bodes reagiram ao teste hiposmótico.

Os valores médios obtidos neste estudo para coloração supravital foram abaixo dos registrados por Castilho (2008), que obteve valores médios de 88,6%. Já Rovay (2006), avaliando o sêmen fresco de bodes das mesmas raças utilizadas neste estudo, encontrou valores bem superiores para a avaliação da viabilidade seminal, 90,05%. Os valores encontrados neste estudo para motilidade estão um pouco acima dos valores observados em comparação com a coloração supravital. No entanto, esta coloração é um teste quantitativo e a motilidade uma avaliação subjetiva.

### **3.2. Sêmen resfriado**

Os resultados observados para o sêmen resfriado após 24 horas de armazenamento estão dispostos na Tabela 2, de acordo com o tratamento submetido ao sêmen. Após o período de 24 horas, as amostras que compuseram o tratamento 1 (20% de gema-de-ovo) apresentaram resultados inferiores quanto às características de motilidade, vigor, supravital e teste

Tabela 2 – Características físicas e qualitativas do sêmen resfriado a 5°C de bodes Alpinos e Saanen, segundo o tratamento submetido

Tratamento	Motilidade	Vigor	Supravital	Hiposmótico
T1	68,5 ± 15,4a	2,5 ± 0,6a	59,4 ± 17,2a	42,2 ± 15,7a
T2	78,0 ± 5,5b	3,2 ± 0,3b	71,1 ± 10,5b	56,2 ± 11,5b
Média ± S	73,3 ± 12,5	2,8 ± 0,5	65,2 ± 15,4	49,2 ± 15,4

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste SNK.

T1 = 20% de gema-de-ovo; T2 = 2,5% de gema-de-ovo.

hiposmótico, quando comparadas às amostras que compuseram o tratamento 2 (2,5% de gema-de-ovo). Esses valores confirmam a recomendação feita por Evans e Maxwell (1987), que sugerem a utilização de 2,5% de gema-de-ovo ao volume total do diluente de sêmen de caprinos, a fim de evitar os danos causados pela enzima produzida nas glândulas bulbouretrais, que é tóxica aos espermatozoides (IRITANI; NISHIKAWA, 1961, 1963).

Os valores obtidos neste experimento para motilidade e vigor espermático são superiores aos resultados obtidos por Siqueira *et al.* (2009), que também utilizando diluidor com baixa concentração de gema-de-ovo no armazenamento do sêmen, por 24 horas, obtiveram motilidade e vigor de 62,50 e 3,27, respectivamente. Por outro lado, resultados acima dos obtidos neste experimento foram observados por Singh e Purbey (1996), que após 24 horas de resfriamento a 5°C, em meio diluidor Tris, com 20% de gema, obtiveram valores de motilidade de 74,52%. Bispo (2005), utilizando diluente citrato-gema, obteve resultados semelhantes de 70% de motilidade e vigor de 3,17, com o mesmo tempo de armazenamento deste experimento. Já Siqueira (2006), utilizando sêmen não lavado e diluidor Tris com 2,5% de gema, observou valores de 62,5% e 3,38 para motilidade e vigor, respectivamente. Esses resultados são inferiores aos obtidos nesse estudo, em ambos os tratamentos.

Leboeuf *et al.* (2000) relatam que a maioria dos estudos relacionados à preservação do sêmen não lavado e resfriado apresenta viabilidade e fertilidade por até 5-8 horas. Esses autores também descrevem que períodos de armazenamento mais longos, como 12 ou 24 horas, resultam em baixa taxa de fertilidade, o que não foi observado neste trabalho, em que a média nos dois tratamentos para os parâmetros de motilidade e vigor espermático foram de 73,3 e 2,8%, respectivamente, independentemente do percentual de gema-de-

ovo utilizado no diluente. No entanto, no diluente com baixa quantidade de gema-de-ovo obteve maior média (78,0%).

Quanto aos valores médios para coloração supravital (Tabela 2), o Tratamento 1 foi o que obteve menor média, alcançando 59,4% ao longo das 24 horas de resfriamento. Com relação ao Tratamento 2, pode-se verificar média de 71,1%. Analisando esses valores, pode-se verificar que o diluidor contendo 2,5% de gema-de-ovo preservou melhor a integridade dos espermatozoides mantidos sob resfriamento, o que vem corroborar com a recomendação de Evans e Maxwell (1987). Resultados superiores a 80% de células vivas foram registrados por Bispo (2005), no mesmo tempo de armazenamento.

O teste hiposmótico revelou resultados médios para o tratamento 1 e 2 de 42,2 e 56,2%, respectivamente. Foi verificada a superioridade do tratamento 2 em relação ao tratamento 1 no que diz respeito à preservação do sêmen caprino mantido resfriado por 24, horas a 5°C. Palhão (2006) obteve resultados para teste hiposmótico bastante variáveis, de acordo com o reprodutor em questão, em que os resultados variaram de 51,8 até 88,2% de células reativas. Vale salientar que o teste hiposmótico é um teste complementar e que não deve ser analisado de forma isolada, e sim de forma conjunta com os outros testes de avaliação espermática.

### **3.3. Fertilidade do sêmen resfriado**

Os valores médios e os desvios-padrão para local de deposição do sêmen, aspecto do muco, peso das fêmeas, escore de condição corporal e duração do estro (horas) estão na Tabela 3. Não houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. A análise desses dados nos permite inferir que nenhum dos tratamentos sofreu favorecimento por ocasião de possíveis mudanças relacionadas às variáveis em questão, fato este que aumenta a confiabilidade dos resultados de prenhez descritos adiante.

Os resultados obtidos nesse experimento para taxa de gestação foram de 31,25% para os animais inseminados com o sêmen submetido ao tratamento 1 e de 66,67% para os animais que receberam o tratamento 2, apresentando diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 4). Desta forma, é notável que o sêmen caprino, quando conservado por meio do resfriamento

Tabela 3 – Parâmetros de controle entre o tratamento com relação ao local de deposição do sêmen, aspecto do muco, peso, escore corporal e duração do estro

Tratamento	Local (1-3)	Muco (1-3)	Peso (kg)	Escore (1-5)	Duração do Estro (horas)
1	2,7 ± 0,4a	2,1 ± 0,3a	48,5 ± 8,2a	3,0 ± 0,4a	33,3 ± 9,1a
2	2,9 ± 0,2a	2,0 ± 0,4a	49,2 ± 8,0a	2,9 ± 0,4a	28,8 ± 8,5a
Médias ± S	2,8 ± 0,3	2,0 ± 0,4	48,8 ± 8,0	2,9 ± 0,4	31,2 ± 9,0

Local: (1) cervical superficial; (2) cervical; e (3) intrauterino. Muco: (1) cristalino; (2) estriado; e (3) caseoso. Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste SNK.

Tabela 4 – Taxa de gestação aos 30 dias e prolificidade de cabras inseminadas com sêmen armazenado com 20% (T1) e 2,5% (T2) de gema-de-ovo no diluente

Tratamento	Total de Animais	Taxa de Gestação (n)	Prolificidade (%)
1	32	31,25% (10)a	1,33 ± 0.50a
2	36	66,67% (24)b	1,44 ± 0.51a

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

com diluidor contendo baixo porcentual de gema-de-ovo no diluente, apresenta características favoráveis à preservação das células espermáticas, favorecendo, desta forma, a taxa de gestação.

Siqueira *et al.* (2009) inseminaram 62 fêmeas da raça Toggenburg com sêmen armazenado em diluente Tris-frutose gema-de-ovo a 2,5% e resfriado a 5°C, por 24 horas, e obtiveram taxas de concepção com uma única inseminação, 12 horas após a identificação do cio de 42,86%. Estes resultados foram superiores aos do tratamento 1 e inferiores aos do tratamento 2. Contudo, a dose inseminante utilizada por esses autores foi de  $150 \times 10^6$  sptz/0,25 mL. Resultados bem superiores aos obtidos neste trabalho foram descritos por Roca *et al.* (1997), que utilizaram sêmen de bodes da raça murciana preservado em diluente tris-gema com 2% de gema-de-ovo e resfriado a 5°C. Esses autores obtiveram uma taxa de concepção de 73,5% (84 fêmeas), porém após duas inseminações durante o período de estro, o que justifica a elevada taxa de gestação, devido à possibilidade de inseminar em um momento mais próximo da ovulação. No entanto, no presente estudo foi realizada apenas uma

inseminação 12 horas após o início do estro. Um outro fator a ser considerado é que esses autores utilizaram concentrações espermáticas por dose inseminante de  $240 \times 10^6$  sptz, enquanto a utilizada neste experimento foi de  $100 \times 10^6$  sptz/dose.

Vale a pena ainda chamar a atenção para o fato de que as doses inseminantes no momento da inseminação encontravam-se abaixo da quantidade de células viáveis na dose inseminante, uma vez que, com o passar do tempo, a quantidade de células viáveis diminuiu, alcançando média de 73,3% ao final do período de armazenamento (24 horas). Desta forma, as amostras que no início do resfriamento apresentavam-se com motilidade média de 87,9% (Tabela 1), ao final das 24 horas a 5°C reduziram em aproximadamente 14,64% o número de células viáveis com potencial fecundante. Este fato, além da quantidade de gema-de-ovo presente no diluente do T1, também pode ter contribuído para a redução no número de cabras gestantes, uma vez que a quantidade de espermatozoides a menos no T1 foi de aproximadamente  $10 \times 10^6$  por dose inseminante.

O resultado de fertilidade obtido quando se utilizou o tratamento 2 está dentro das taxas de gestação recomendadas por Dautier (1966), Corteel (1971), França (1981) e Vivanco *et al.* (1982). Esses autores relataram valores variando de 60,7 a 87%, após uma única inseminação, realizada entre 12-24 horas após o início do estro natural, mesmo período utilizado para as realizações das inseminações no estudo aqui descrito, e também o mesmo número de inseminações realizadas por cabra em estro.

#### **4. Conclusão**

Mediante as análises seminais realizadas *in vitro* e dos resultados obtidos por meio da fertilidade *in vivo*, constata-se que o diluente citrato-gema na concentração de 2,5% de gema-de-ovo pode ser utilizado na conservação do sêmen caprino resfriado a 5°C, durante 24 horas.

## 5. Referencias Bibliográficas

AYRES, M.; AYRES JR.; M., AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 2.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2000. 272 p.

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

BITTENCOURT, R.; RIBEIRO FILHO, A.; SANTOS, A.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.; VASCONCELOS, M.; LEANDRO, E.; GUIMARÃES, J. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 631, 2006.

BLOM, E. **The evaluation of bull sêmen with special reference to its use in artificial insemination (trans).** 1950. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Copenhagen: Montensen, 1950.

CASTILHO, E. F. **Uso da propólis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino.** 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.

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

CORTEEL, J. M. L'insemination artificielle caprine. **Bull. Téc. D'inform.**, v. 257, p. 1-4, 1971.

DAUZIER, L. Artificial insemination in the goat. In: DALLING (Ed.). **Int. Encyclopedia of Veterinary Medicine.** W. Green and Soon, 1966. p. 269-271.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats.** Australia: Butterworths Pty Limited, 1987. 194 p.

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

FRANÇA, M. P. **Inseminação artificial com sêmen congelado de caprino no sertão do estado de Pernambuco.** 1981. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, 1981.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of sêmen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-23, 2000.

IRITANI, A. J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. **Proceedings...** Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry Kyoto University, 1961. p. 97-104.

IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen: IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. **Jpn. J. Anim. Reprod.**, v. 8, p. 113-117, 1963.

KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriog.**, v. 48, p. 1049-1059, 1997.

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

MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte-MG, v. 19, n. 1-2, p. 61-72, 1995.

MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K. N.; OTT, R. S. Comparison of sêmen collection techniques in goats. **Theriogenology**, v. 26, n. 6, p. 823-827, 1986.

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

PALHÃO, M. P. **Avaliação do sêmen caprino diluído em citrato-gema, resfriado e armazenado a 5°C por 24 horas**. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CASTILHO, E. F. **Uso da propólis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2008.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the dilluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 35, p. 305-312, 1982.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed sêmen of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 36, n. 1, p. 49-59, 1983.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadiana goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Rum. Res.**, v. 25, p. 147-153, 1997.

ROVAY H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

UFV. **SAEG versão 9.0**. Viçosa-MG: UFV, 2005.

SANTOS, M. H. B.; MORAES, E. P. B. X.; GUIDO, S. I.; BEZERRA, F. Q. G. B.; MELO, A. N.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Fetal sexing in Santa Inês ewes by ultrasonography. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 573-578, 2006.

SINGH, L. P.; PURBEY, L. N. Preservability of goat spermatozoa in Tris and Citrate extenders at -196° C and 5° C. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 66, n. 11, p.1139-1141, 1996.

SIQUEIRA, A. P. **Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006..

SIQUEIRA, A. P. *et al.* Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema-de-ovo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 61, n. 2, abr. 2009.

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

SWANSON, W. W.; BEARDEN, H. J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v. 10, p. 981, 1951.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Seminal characteristics of Boer goat bucks as affected by months and seasons of the year. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ON GOATS, New Delhi, India, 1992. **Proceedings...** New Delhi, India, 1992. p. 311.

VIVANCO, W.; MORALES, C. ; NOLTE, E. Comparasion between artificial insemination with frozen sêmen and natural mating in Criollo goats in the North Coast of Peru under range conditions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, Arizona, 1982. **Proceedings...** Arizona, 1982. p. 537.

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

## **Avaliação da fertilidade do sêmen caprino congelado em função das concentrações de gema-de-ovo no diluente**

**Resumo:** O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Reprodução de Caprinos do Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Zona da Mata, no município de Viçosa-MG, durante a estação reprodutiva induzida por suplementação de luz (novembro a dezembro de 2007) e estação fisiológica (março a junho de 2008), Experimento 1 e 2, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e fertilidade *in vivo*, quais as concentrações de gema-de-ovo (25 e 2,5%) presentes no diluente de Martin *et al.* (1979) preservam melhor o sêmen caprino congelado. Os valores médios obtidos no Experimento 1 para o sêmen fresco, quanto ao volume, à motilidade, ao vigor, à concentração espermática, ao teste hiposmótico e à coloração supravital, foram de  $1,3 \pm 0,4$ ;  $87,5 \pm 2,6$  e  $3,8 \pm 0,3$ , respectivamente, e no Experimento 2, de  $1,2 \pm 0,1$ ;  $90,0 \pm 3,7$  e  $3,8 \pm 0,4$ , respectivamente. Os valores médios referentes ao sêmen congelado para o Experimento 1 foram, respectivamente, para T1 e T2 de: motilidade,  $58,7 \pm 5,1\%$  e  $61,2 \pm 5,1\%$ ; vigor,  $2,7 \pm 0,3$  e  $3,1 \pm 0,2$ ; supravital,  $58,7 \pm 7,5$  e  $61,7 \pm 6,15$ . No Experimento 2 foram respectivamente para T1 e T2 de: motilidade,  $54,3 \pm 6,2\%$  e  $60,6 \pm 4,1\%$ ; vigor,  $2,6 \pm 0,2$  e  $3,1 \pm 0,2$ ; supravital,  $56,3 \pm 8,1$  e  $57,7 \pm 6,8$ . As taxas de fertilidade obtidas foram de 46,67% (T1) e 70,00% (T2) no Experimento 1 e no Experimento 2, de 50,00% (T1) e 76,00% (T2). De acordo com os resultados obtidos, pode-se recomendar a utilização do diluente glicose-EDTA com baixa concentração de gema (2,5%) no seu volume total.

**Palavras-chave:** caprinos; sêmen; congelamento; glicose-EDTA; fertilidade.

## Fertility of frozen goat semen in two different egg yolk concentrations in semen extender

**Abstract:** The experiment was carried through in Goat Reproduction Laboratory dependences of Caprine Sector, of Animal Science Department of Federal University of Viçosa, Mata Zone, Viçosa-MG, during no physiological reproductive season by light supplementation (November to December of 2007), and physiological reproductive season (March to June of 2008). Experiment 1 and 2, respectively. The objective of this work was to evaluate by *in vitro* and *in vivo* tests, which the egg yolk concentrations (20% or 2.5%) in semen extender proposed by Martin et al. (1979) it's better to preserve frozen goat semen. The average values in Experiment 1 for fresh semen for volume, motility, vigor, spermatic concentration, hypoosmotic test and supravital coloration were:  $1.3 \pm 0.4$ ;  $87.5 \pm 2.6$  and  $3.8 \pm 0.3$ , respectively and in Experiment 2 of  $1.2 \pm 0.1$ ;  $90.0 \pm 3.7$  and  $3.8 \pm 0.4$ , respectively. The average values of freeze semen in Experiment 1 were: motility,  $58.7 \pm 5.1\%$  and  $61.2 \pm 5.1\%$ ; vigor,  $2.7 \pm 0.3$  and  $3.1 \pm 0.2$ ; supravital test,  $58.7 \pm 7.5$  and  $61.7 \pm 6.15$ , to T1 and T2 respectively. In Experiment 2 were respectively for T1 and T2: motility,  $54.3 \pm 6.2\%$  and  $60.6 \pm 4.1\%$ ; vigor,  $2.6 \pm 0.2$  and  $3.1 \pm 0.2$ ; supravital test,  $56.3 \pm 8.1$  and  $57.7 \pm 6.8$ . The conception rates were 46.67% (T1) and 70.00% (T2) in Experiment 1, and 50.00% (T1) and 76.00% (T2) in Experiment 2. In accordance with obtained results, glucose-EDTA with low egg yolk concentration (2.5%) can be used in goat semen extender.

**Keywords:** goat; semen; frozen; glucose-EDTA; fertility.

## 1. Introdução

No Brasil, a inseminação artificial (IA) em caprinos ainda não atingiu um estado de utilização comparado com a da espécie bovina, em que esta técnica encontra-se bem mais difundida, inclusive com a possibilidade de se encontrar no mercado sêmen de reprodutores provados por meio de teste de progênie.

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado foi revolucionada há aproximadamente 50 anos, por meio da descoberta do glicerol como crioprotetor, o que permitiu que os espermatozoides fossem congelados e armazenados por longos períodos (HOLT, 2000).

Em caprinos, o sêmen foi congelado pela primeira vez por Smith e Polge (1950), e esses autores reportaram a fertilidade pós-descongelamento do sêmen dessa espécie como muito baixa para ser considerada de valor prático. Muitas investigações têm sido feitas sobre a criopreservação do sêmen caprino e todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF *et al.*, 2000). Apesar da praticidade e possibilidade de armazenamento do sêmen por período indeterminado, a viabilidade do sêmen congelado em geral é menor do que quando se utiliza o sêmen resfriado.

A gema-de-ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos, com o intuito de proteger contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que aderem a membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando, com isso, a membrana do espermatozoide (MOUSSA *et al.* 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, consequentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996).

Apesar dos benefícios que foram evidenciados sobre a utilização da gema-de-ovo em diluentes de sêmen, alguns autores sugerem o seu uso diferenciado quando o sêmen é proveniente da espécie caprina. Roy (1957) afirmou que diluentes que contêm gema-de-ovo em sua composição não são recomendados para utilização em sêmen caprino. Tal evidência deve-se ao

fato de que o plasma seminal caprino contém uma enzima secretada pelas glândulas bulbouretrais, que quando em presença da gema-de-ovo, por hidrólise, leva à formação de lisolecitinas, substâncias estas tóxicas para a célula espermática.

Na busca de tornar o processo de conservação celular mais prático e menos danoso às células espermáticas, Evans e Maxwell (1987) propuseram a utilização de um diluente com baixa concentração de gema-de-ovo (2,5%).

Martin *et al.* (1979), trabalhando com o congelamento do sêmen equino, associaram ao diluente uma substância emulsificante, o Orvus-es-paste, que aumenta a disponibilidade e a capacidade protetora dos fosfolipídios. O sêmen congelado com o Orvus-es-paste apresentou motilidade total superior ao diluente sem o agente emulsificador após o descongelamento (53,4% x 42,3%), atuando como um importante protetor da membrana acrossomal durante o congelamento.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e fertilidade *in vivo*, quais as concentrações de gema-de-ovo (20% e 2,5%) no diluente de Martin *et al.* (1979) viabilizam melhor a preservação do sêmen caprino congelado.

## **2. Material e Métodos**

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Reprodução de Caprinos do Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, durante a estação reprodutiva induzida por suplementação de luz (novembro a dezembro de 2007) e estação fisiológica (março a junho de 2008), situado na Região-II do Estado de Minas Gerais, Brasil, correspondente à Zona da Mata, no município de Viçosa, situado a 20°45'20" latitude S e 42°52'40" W Gr, altitude média de 752,5 m, temperatura média anual de 20,9°C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso) pela classificação de Köppen.

Os animais receberam alimentação volumosa composta de silagem de milho, concentrado proteico e mistura mineral que atendeu às exigências nutricionais das seguintes categorias: reprodutores, fêmeas em lactação e

fêmeas solteiras. O controle sanitário dos animais foi realizado periodicamente, conforme o esquema preestabelecido pelo setor de Caprinocultura da UFV.

Em ambos os experimentos foram utilizados sêmen congelado de dois bodes férteis (Alpino e Saanen), conforme o histórico reprodutivo e com exame andrológico aprovado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Os animais foram mantidos em baias individuais.

Para o Experimento 1, realizado durante a estação reprodutiva fisiológica, foram utilizadas 60 fêmeas das raças Saanen e Alpina, em idade reprodutiva, com pelo menos um parto, tendo 30 fêmeas recebido o sêmen do tratamento 1 (T1- 20% de gema-de-ovo) e 30 recebido o sêmen do tratamento 2 (T2- 2,5% de gema-de-ovo).

No Experimento 2, realizado durante a estação reprodutiva induzida por luz, foram utilizadas 50 fêmeas das raças Saanen e Alpina, em idade reprodutiva, com pelo menos um parto, tendo 24 fêmeas recebido o sêmen do tratamento 1 (T1- 20% de gema-de-ovo) e 26 recebido o sêmen do tratamento 2 (T2- 2,5% de gema-de-ovo).

As coletas de sêmen foram realizadas três vezes na semana, com intervalo de um dia entre as coletas, durante o período da tarde. O método de coleta foi o da vagina artificial, de acordo com Memon *et al.* (1986). Após a coleta foram realizadas as avaliações microscópicas quanto aos aspectos físico (motilidade e vigor espermático) e morfológico (BLOM, 1950) e à coloração supravital com eosina-nigrosina.

A coloração supravital avalia a integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides, classificando-os em vivos (os que não se coram) e mortos (corados de rosa-claro ou de coloração avermelhada) (SMITH e MURRY, 1997). Para tanto, amostras de 10  $\mu$ L do sêmen fresco ou resfriado foram adicionadas na proporção de 1:1, com solução de eosina-nigrosina, em lâmina previamente aquecida a 37°C. Após 30 segundos, foi feito o esfregaço e avaliou-se a porcentagem de espermatozoides vivos, com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 40X (MAYER *et al.*, 1951; SWANSON; BEARDEN, 1951).

Após a coleta, o sêmen foi dividido em dois volumes iguais, e em seguida cada alíquota foi diluída na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor), de

acordo com o tratamento proposto (T1 ou T2). Utilizando-se uma câmara de Neubauer, foi realizada a concentração espermática de cada fração e determinado o volume de diluidor necessário para a concentração final de  $200 \times 10^6$  de espermatozoides por mL. O diluente utilizado foi o de Martin *et al.* (1979), utilizado em congelamento de sêmen de equinos. Este diluente, quando utilizado para congelar o sêmen do T2, sofreu modificação quanto à quantidade de gema-de-ovo (2,5%). O restante do volume do diluidor (17,5 mL) foi completado, utilizando-se solução de citrato de sódio a 3%.

No Experimento 1 o sêmen foi congelado de forma total, ou seja, não passou pelo processo de centrifugação para retirada do plasma seminal. Já no Experimento 2 o sêmen congelado no T1 (20% de gema-de-ovo) passou pelo processo de centrifugação, para retirada do plasma seminal. A solução utilizada para diluição do sêmen a ser centrifugado foi a de ringer-lactato de sódio. A centrifugação de sêmen foi realizada durante 10 minutos, com 600G (DELL'AQUA JUNIOR; PAPA, 2001).

O sêmen foi acondicionado em palhetas de 0,5 mL, o que resultou em uma dose inseminante de  $100 \times 10^6$  de espermatozoides.

Após o envase, as palhetas contendo seus respectivos tratamentos foram resfriadas, utilizando curva de resfriamento segundo Bispo (2005), em que as palhetas com o sêmen foram colocadas em um tubo de ensaio de 20 mL, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo de ensaio revestido por um refil (saco plástico) foi colocado dentro de um recipiente de plástico de aproximadamente 240 mL, contendo 120 mL de álcool absoluto. O recipiente com as palhetas foi então colocado na posição horizontal dentro da geladeira. Decorridos 35 minutos do início do resfriamento, o tubo de ensaio que continha as palhetas foi retirado do recipiente plástico e mantido à temperatura de geladeira por mais 25 minutos, perfazendo um tempo total de resfriamento de 60 minutos.

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas de cada tratamento sobre um suporte de aço inoxidável na posição vertical, a uma altura de 4 cm acima do nível do nitrogênio líquido, dentro do botijão criogênico, durante 15 minutos. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio no próprio botijão, para o congelamento final do

sêmen (FURST, 2006), sendo em seguida colocadas em raques devidamente identificadas e armazenadas em botijão com nitrogênio.

Após o congelamento e antes das inseminações, as partidas de sêmen produzidas foram avaliadas *in vitro*. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C, por um período de 30 segundos. As análises realizadas no sêmen descongelado foram as mesmas realizadas para o sêmen a fresco.

O diluidor aqui utilizado foi o descrito por Martin *et al.* (1979). Para o segundo tratamento (T2), foi utilizado, o mesmo diluidor, sendo modificado pela redução da quantidade de gema-de-ovo, que foi de 2,5%.

#### *Diluidor Glicose-EDTA (MARTIN et al., 1979)*

##### *Solução 1*

Reagentes	Tratamento 1	Tratamento 2
Glicose	6,0 g	6,0 g
Citrato de sódio diidratado	0,375 g	0,375 g
EDTA dissódico	0,370 g	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,120 g	0,120 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL	100 mL
Gentamicina	0,8 mg/100 mL	0,8 mg/100 mL

##### *Solução 2*

Reagentes	Tratamento 1	Tratamento 2
Solução de lactose a 11%	50 mL	50 mL
Solução de citrato de sódio a 3%	0 mL	17,5 mL
Solução 1	25 mL	25 mL
Gema-de-ovo	20 mL	2,5 mL
<i>Orvus es paste</i>	0,5 mL	0,5 mL
Glicerol	5 mL	5 mL
Osmolaridade	1.121 mOsm/kg	1.107 mOsm/kg

As inseminações artificiais foram realizadas pela técnica transcervical (MIES FILHO, 1987). Neste procedimento foi utilizado aplicador universal para caprinos (Minitube) e a bainha de revestimento (Minitube) foi a de ponta excêntrica. Antes da realização da inseminação artificial, cada animal foi pesado e avaliado quanto ao escore de condição corporal (1 – 5). O rufião foi levado à presença das fêmeas a cada 12 horas, a fim de detectar o início do estro, caracterizado pela aceitação da monta por estas fêmeas. As rufiações

ocorreram até a fêmea não mais aceitar a monta, a fim de quantificar a sua duração.

As inseminações foram feitas, de preferência, intrauterinamente, 24 horas após o início do estro, colocando-se a fêmea de cabeça para baixo e apoiada sobre um cavalete apropriado, que facilita o posicionamento do genital feminino para realização das inseminações. Com o auxílio de um espéculo tipo bico de pato e de uma fonte de luz, foram visualizados a entrada da cérvix e o aspecto do muco. O tempo para realização das inseminações não ultrapassou 1,5 minuto.

No momento da inseminação foi observado o aspecto do muco cervical e quantificado como 1 – cristalino, 2 – estriado e 3 – caseoso.

Logo após a inseminação foi anotado o local de deposição do sêmen, em que 1 – cervical superficial, 2 – cervical e 3 – intrauterino.

O diagnóstico de gestação foi efetuado aos 30 dias pós-inseminação, com o auxílio de aparelho ultrassonográfico equipado com transdutor linear de 5,0 MHz, por via retal. Foi também realizada a quantificação fetal para posterior quantificação da prolificidade.

Análise estatística: os dados paramétricos referentes à qualidade do sêmen, como motilidade, vigor, morfologia espermática e número de espermatozoides vivos e mortos (supravital), foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste SNK, utilizando-se o programa SAEQ 9.0 (UFV, 2005). Os dados qualitativos não paramétricos (taxa de gestação) foram testados pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (AYRES *et al.*, 2000).

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Sêmen fresco**

Para o Experimento 1 foram realizadas quatro coletas de sêmen de cada bode, totalizando oito coletas, destinadas ao congelamento do sêmen e à realização das inseminações, da mesma forma para o Experimento 2.

Na Tabela 1 estão os dados relacionados aos valores de motilidade, vigor e volume seminal dos ejaculados.

Tabela 1 – Médias e desvio-padrão para motilidade, vigor e volume seminal do sêmen fresco

	Experimento 1			Experimento 2		
	Volume	Motilidade	Vigor	Volume	Motilidade	Vigor
Bode 1	1,5 ± 0,4a	88,7 ± 2,5a	3,8 ± 0,2a	1,3 ± 0,1a	90,0 ± 4,0a	3,6 ± 0,4a
Bode 2	1,0 ± 0,3a	86,2 ± 2,5a	3,8 ± 0,4a	1,1 ± 0,9b	90,0 ± 4,0a	4,0 ± 0,4a
Médias ± S	1,3 ± 0,4	87,5 ± 2,6	3,8 ± 0,3	1,2 ± 0,1	90,0 ± 3,7	3,8 ± 0,4

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

Quanto ao volume, os valores médios observados para todos os bodes, em ambos os experimentos, encontraram-se acima do valor mínimo recomendado pelo CBRA (1998), que é de 0,8 mL.

Da mesma forma, os valores para motilidade e vigor obtidos nos dois experimentos estão acima do valor mínimo exigido para o sêmen caprino a fresco sugerido pelo CBRA (1998), que é, respectivamente, de 70% e 3,0. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os bodes nos dois períodos experimentais.

Na Tabela 2 estão sumariados os valores relativos à coloração supravital e concentração espermática.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão para coloração supravital e concentração espermática do sêmen fresco

	Experimento 1		Experimento 2	
	Supravital (%)	Concentração ( $\times 10^9$ )	Supravital (%)	Concentração ( $\times 10^9$ )
Bode 1	86,5 ± 4,0a	3,0 ± 0,8a	82,0 ± 4,7a	3,1 ± 0,9a
Bode 2	88,7 ± 3,6a	2,1 ± 0,2a	76,2 ± 6,2a	1,4 ± 0,4a
Médias ± S	87,6 ± 3,7	2,5 ± 0,7	76,2 ± 6,2	2,2 ± 1,1

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste SNK.

Observando os dados obtidos por Castilho (2008), tem-se para coloração supravital valor médio de 88,6, um pouco superior aos valores aqui registrados. Rovay (2006) constatou valores para concentração espermática e coloração supravital variando de  $2,0 \times 10^9$  a  $2,2 \times 10^9$ /mL e de 88,8 a 92,6%, respectivamente. Tais valores são semelhantes aos aqui observados, com alguma variação devido a fatores inerentes a particularidades de cada experimento. Porém, para o sêmen caprino fresco esses valores encontram-se normais para o sêmen fresco dessa espécie (BETINI *et al.*, 1998). O valor

normal da concentração espermática para caprinos está em torno de  $3 \times 10^9$ , podendo variar entre  $2,0 \times 10^9$  e  $5,0 \times 10^9$  por ejaculado (CASTELO *et al.*, 2008). Entretanto, no Experimento 2, o bode 2 apresentou concentração média de  $1,4 \times 10^9$  por ejaculado; este menor valor possivelmente está relacionado ao fato desse reprodutor ter sido mais utilizado em regime de monta natural que o bode 1.

A morfologia espermática (Tabela 3) está agrupada em defeitos maiores e defeitos menores. Pode-se notar que a totalidade dos defeitos, em ambos os experimentos, é bastante baixa. Esse dado revela que todos os animais estavam em perfeitas condições de serem doadores de sêmen para o experimento (CBRA, 1998), independentemente do experimento em questão.

Tabela 3 – Médias e desvio-padrão para morfologia espermática do sêmen fresco

	Experimento 1		Experimento 2	
	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Defeitos Menores
Bode 1	1,75 ± 2,36a	1,00 ± 1,15a	1,65 ± 1,46a	3,00 ± 2,12a
Bode 2	0,50 ± 1,00a	1,00 ± 0,81a	0,60 ± 1,27a	4,00 ± 1,61a
Médias ± S	1,12 ± 1,80	1,00 ± 0,92	1,12 ± 1,80	1,00 ± 0,92

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 4 estão dispostos os valores para volume seminal, motilidade, vigor, supravital, concentração, defeitos maiores e defeitos menores do sêmen fresco, comparados entre os Experimentos 1 e 2.

Ao analisar os dados dispostos na Tabela 4, pode-se observar que com exceção dos valores da coloração supravital, não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os parâmetros observados quando os Experimentos 1 e 2 foram comparados. A ação do fotoperíodo é, segundo Mies Filho (1989), tanto mais intensa quanto maior a latitude. No local do presente estudo, Viçosa-MG, a latitude atinge  $20^{\circ}45'20''$  latitude S e  $42^{\circ}52'40''$  W Gr. Nesta latitude, mediante os dados observados, os parâmetros seminais para o sêmen fresco não sofreram alterações por causa da estação do ano.

Tabela 4 – Médias e desvio-padrão para volume seminal, motilidade, vigor, supravital, concentração, defeitos maiores e defeitos menores do sêmen fresco, entre experimentos

	Experimento 1	Experimento 2
<b>Bode 1</b>		
Volume (mL)	1,5 ± 0,4a	1,3 ± 0,1a
Motilidade (%)	88,7 ± 2,5a	90,0 ± 4,0a
Vigor (0-5)	3,8 ± 0,2a	3,6 ± 0,4a
Supravital (%)	86,5 ± 4,0a	82,0 ± 4,7b
Concentração (x10 <sup>9</sup> )	3,0 ± 0,8a	3,1 ± 0,9a
Defeitos maiores (%)	1,75 ± 2,36a	1,65 ± 1,46a
Defeitos Menores (%)	1,00 ± 1,15a	3,00 ± 2,12a
<b>Bode 2</b>		
Volume (mL)	1,0 ± 0,3a	1,1 ± 0,9b
Motilidade (%)	86,2 ± 2,5a	90,0 ± 4,0a
Vigor (0-5)	3,8 ± 0,4a	4,0 ± 0,4a
Supravital (%)	88,7 ± 3,6a	76,2 ± 6,2b
Concentração (x10 <sup>9</sup> )	2,1 ± 0,2a	1,4 ± 0,4a
Defeitos Maiores (%)	0,50 ± 1,00a	0,60 ± 1,27a
Defeitos Menores (%)	1,00 ± 0,81a	4,00 ± 1,61a

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

### 3.2. Sêmen congelado

Para o sêmen congelado, os valores de motilidade, vigor e coloração supravital estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios para características físicas e qualitativas do sêmen congelado de bodes das raças Saanen e Alpina

Tratamento	Experimento 1			Experimento 2		
	Motilidade	Vigor	Supravital	Motilidade	Vigor	Supravital
T1	58,7 ± 5,1a	2,7 ± 0,3a	58,7 ± 7,5a	54,3 ± 6,2a	2,6 ± 0,2a	56,3 ± 8,1a
T2	61,2 ± 5,1a	3,1 ± 0,2b	61,7 ± 6,1a	60,6 ± 4,1a	3,1 ± 0,2b	57,7 ± 6,8a
Médias ± S	60,0 ± 5,1	2,9 ± 0,3	60,2 ± 6,8	57,5 ± 6,0	2,8 ± 0,3	57,0 ± 7,3

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente (p < 0,05).

T1 = 20% de gema-de-ovo; T2 = 2,5% de gema-de-ovo.

Os dados obtidos nos dois experimentos apontam para uma similaridade dos resultados, embora estes dados tenham sido gerados em épocas do ano diferentes (dentro e fora da estação reprodutiva) e, conseqüentemente, situação

fisiológica diferente, possivelmente no que diz respeito ao plasma seminal dos animais. Vale lembrar que no Experimento 1 o sêmen foi processado para o congelamento sem passar pelo processo de retirada do plasma seminal e no Experimento 2 foi retirado o plasma seminal do sêmen submetido ao tratamento 1. Essa diferença ocorreu devido ao não congelamento das amostras do Tratamento 1, possivelmente pelo fato de estas apresentarem alto nível de gema-de-ovo (20%) no diluente, o que não ocorreu com o Tratamento 2. La Falci *et al.* (2002) estudaram as variações ocorridas na produção de enzimas do plasma seminal de bodes durante o ano e relatam haver diferença na produção da enzima coaguladora da gema-de-ovo (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997).

Os benefícios obtidos pela remoção do plasma seminal podem variar. Algumas pesquisas indicam que a remoção é necessária para o plasma seminal, maximizando a motilidade pós-congelamento e a integridade acrossomal no sêmen caprino (DROBNIS *et al.*, 1980; RITAR; SALAMON, 1982; MEMON *et al.*, 1985), enquanto outros autores relatam resultados positivos para o sêmen congelado sem lavar (RITAR; SALAMON, 1982; AZEREDO *et al.*, 2001). É ainda importante ressaltar que em experimento realizado por Cavalcante (2003) foram encontradas dosagens de progesterona de 346,7 ng/dL para a estação reprodutiva e de 288,57 ng/dL, fora da estação reprodutiva. Essas diferenças nas dosagens podem ser suficientes para tornar a glândula bulbouretral desses animais mais ativa, e daí secretarem mais enzimas coaguladoras da gema-de-ovo.

Apesar dos variados resultados descritos pelos citados autores, o sêmen congelado apresentou, no Experimento 1, média de 60,0 % de motilidade, 2,9 de vigor e 60,2 para coloração supravital, sendo observada diferença ( $P < 0,05$ ) para vigor entre os tratamentos 1 e 2. No Experimento 2, os valores médios observados para as mesmas características foram  $57,5 \pm 6,0\%$ ,  $2,8 \pm 0,3\%$  e  $57,0 \pm 7,3\%$ , respectivamente. Semelhantemente ao Experimento 1, para o vigor foi observada diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos 1 e 2. Os valores obtidos nos tratamentos e em ambos os experimentos estão de acordo com o mínimo exigido pelo CBRA (1998) para utilização de sêmen congelado.

Aboagla e Terada (2003) demonstraram o uso de um diluente à base de trealose e gema-de-ovo (20%) e verificaram, após descongelação, motilidade

progressiva de 57%, enquanto os resultados para tris-citrato-gema (20%) ficaram em 46%. Utilizando-se de metodologia similar à destes experimentos, Rovay (2006), usando diluente leite desnatado-gema, observou valores de 49,1, 2,0 e 44,4% para motilidade, vigor e supravital.

Tabela 5 – Médias e desvio-padrão para defeitos maiores e defeitos menores do sêmen congelado

Tratamento	Experimento 1		Experimento 2	
	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Defeitos Menores
T1	5,1 ± 2,2 a	2,0 ± 1,1 a	4,7 ± 1,4 a	2,2 ± 1,4 a
T2	2,6 ± 1,4 b	0,7 ± 0,8 b	2,5 ± 0,7 b	3,1 ± 1,8 a
Médias ± S	3,8 ± 2,2	1,3 ± 1,2	3,6 ± 1,6	2,6 ± 1,6

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

T1 = 20% de gema-de-ovo; T2 = 2,5% de gema-de-ovo.

No tocante à morfologia espermática discriminada na Tabela 5, pode-se observar que os valores para defeitos maiores, assim como para defeitos menores, permaneceram baixos, sendo todas as partidas de sêmen congeladas aprovadas para utilização na inseminação das cabras de acordo com o proposto pelo CBRA (1998). Portanto, em ambos os experimentos não houve nenhum defeito que chamasse atenção.

### 3.3. Fertilidade do sêmen congelado

As inseminações foram todas realizadas após 24 horas da verificação do início do estro, o que foi realizado com o auxílio de rufiões.

As médias referentes ao local de deposição, aspecto do muco, peso, escore e tempo de permanência das fêmeas em cio (horas) foram dispostas na Tabela 6.

O local de deposição do sêmen na hora da IA tem papel de relevante importância na taxa de fertilidade, sendo os piores resultados obtidos quando a sua deposição é feita na vagina e os melhores alcançados quando o sêmen é depositado intra-uterinamente (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1988). Para o local de deposição, as médias neste experimento foram acima de 2,8, em escala de 1 a 3, significando que a maioria das inseminações foi realizada dentro do útero.

Essa elevada taxa de passagem pela cervix pode estar relacionada ao fato de as IA terem sido realizadas 24 horas do início do estro. Já no experimento do capítulo anterior, a taxa de passagem foi menor, possivelmente devido às inseminações terem ocorrido 12 horas após o início do estro. Ferrari *et al.* (1998) realizaram 16 inseminações, seis foram intracervicais profundas, duas intracervicais superficiais e oito intrauterinas. No entanto, os autores não relataram quanto tempo após o início do estro foram realizadas as IA. Segundo Barbosa (1999), a facilidade de transposição cervical está relacionada a vários fatores, como: fase do ciclo estral em que a fêmea se encontra, variação individual da anatomia cervical, categoria reprodutiva e habilidade do inseminador. Ritar e Salamon (1983) verificaram que a proporção de cabras em que é possível realizar a inseminação intra-uterina varia de 12 a 53% nos trabalhos realizados e que a profundidade da IA influencia significativamente a taxa de fertilidade.

A observação do muco, e de sua alteração durante o período de cio, pode ser usada para estimar o melhor momento do estro para realizar a inseminação, uma vez que há correlação entre o tipo de muco observado no momento da inseminação e a taxa de fertilidade. Neste estudo o muco foi classificado de 1 a 3, sendo o 1 – classificado como cristalino, 2 – estriado e 3 – caseoso. Dessa forma, o melhor momento para realizar a inseminação é quando o muco apresenta-se estriado e abundante, que corresponde ao terço médio para o final do estro (SIQUEIRA, 2009).

Neste estudo, independentemente do experimento realizado, as médias observadas para aspecto do muco se mantiveram próximas a 2,0, caracterizando que a maioria das cabras foi inseminada em um momento próximo ao final do estro, possivelmente coincidindo com o momento da ovulação.

França (1981) observou taxas de fertilidade ao parto de 76,2 e 86,4% quando as cabras foram inseminadas com o muco cervical apresentado-se com aspecto cristalino e estriado, respectivamente.

Com relação ao peso e ao escore de condição corporal, foram observados pesos variando de 47,0 e 54,5 kg no primeiro experimento e de 49,8 kg e 50,1 kg no segundo experimento, e escores variando de 2,8 e 2,8 no Experimento 1, e de 2,9 e 2,8 no Experimento 2, para os tratamentos T1 e T2, respectivamente. Palhão (2006) relatou pesos e escore variando de 31,9 a

Tabela 6 – Parâmetros de controle entre o tratamento com relação ao local de deposição do sêmen, aspecto do muco, peso, escore corporal e duração do estro

	Experimento 1		Experimento 2	
	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 1	Tratamento 2
Local	2,8 ± 0,3 a	2,9 ± 0,2 a	2,8 ± 0,3 a	2,9 ± 0,2 a
Muco	2,0 ± 0,1 a	2,0 ± 0,3 a	2,0 ± 0,1 a	2,0 ± 0,4 a
Peso	47,0 ± 9,0 a	54,5 ± 11,0 a	49,8 ± 10,2 a	50,1 ± 10,5 a
Escore	2,8 ± 0,4 a	2,8 ± 0,3 a	2,9 ± 0,3 a	2,8 ± 0,3 a
Cio (horas)	32,4 ± 8,9 a	30,8 ± 9,8 a	32,8 ± 9,7 a	30,4 ± 8,9 a

Local: 1 – cervical superficial, 2 – cervical e 3 – intrauterino. Muco: 1 – cristalino, 2 – estriado e 3 – caseoso. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

55,6 kg e de 1,8 a 3,1, respectivamente. A duração do estro nos dois experimentos e a obtida entre os tratamentos assemelham-se com os resultados obtidos por Palhão (2006), que observou média de duração de estro de 33,87 horas, trabalhando com animais do mesmo rebanho. Siqueira *et al.* (2009) encontraram média de 32,24 ± 12,09 horas para cabras com cio induzido por prostaglandina F2 $\alpha$  durante a estação de monta.

Na Tabela 7 os mesmos parâmetros observados anteriormente na Tabela 6 foram comparados entre experimentos. Pode-se observar que não houve diferença ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros observados.

Os resultados de fertilidade estão dispostos na Tabela 8. Quanto aos dados referentes ao Experimento 1, observa-se que o T1 foi inferior ao T2 ( $p > 0,05$ ), de onde se obteve a média de 46,67 e 70,00%, respectivamente. Dorado *et al.* (2007) utilizaram diluente tris-gema com 20% de gema-de-ovo e obtiveram taxas de prenhez de 47,62%, resultados bem próximos aos encontrados para o T1. Taxas de fertilidade semelhantes foram obtidas em outras raças com sêmen congelado com 20% de gema-de-ovo: 51% na raça Angorá (RITAR; SALAMON, 1983) 39,1% na raça Cashemira (RITAR *et al.*, 1990) e 57% na Murciana-Granadina (SALVADOR *et al.*, 2005). Por outro lado, Barbas *et al.* (2008), utilizando diluente com baixa concentração de gema-de-ovo, obtiveram valor médio de prenhez de 46,4%, inferior aos obtidos no T2. Da mesma forma que os autores anteriores, Ferrari *et al.* (1998) relataram valores para taxa de não retorno ao estro de 31,2%, também utilizando baixa concentração de gema-de-ovo no diluente (1,5%).

Tabela 7 – Parâmetros de controle entre o tratamento com relação ao local de deposição do sêmen, aspecto do muco, peso, escore corporal e duração do estro, entre experimentos

	Experimento 1	Experimento 2
<b>Tratamento 1</b>		
Local	2,8 ± 0,3 a	2,8 ± 0,3 a
Muco	2,0 ± 0,1 a	2,0 ± 0,1 a
Peso	47,0 ± 9,0 a	49,8 ± 10,2 a
Escore	2,8 ± 0,4 a	2,9 ± 0,3 a
Cio (horas)	32,4 ± 8,9 a	32.86 ± 9.72 a
<b>Tratamento 2</b>		
Local	2,9 ± 0,2 a	2,9 ± 0,2 a
Muco	2,0 ± 0,3 a	2,0 ± 0,4 a
Peso	54,5 ± 11,0 a	50,1 ± 10,5 a
Escore	2,8 ± 0,3 a	2,8 ± 0,3 a
Cio (horas)	30,8 ± 9,8 a	30,4 ± 8,9 a

Local: 1 – cervical superficial, 2 – cervical e 3 – intrauterino. Muco: 1 – cristalino, 2 – estriado e 3 – caseoso. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Tabela 8 – Fertilidade do sêmen caprino congelado em diferentes épocas do ano de acordo com os tratamentos

Tratamento	Experimento 1		Experimento 2	
	Total de Animais	Prenhez (%)	Total de Animais	Prenhez
T1	30	14 (46,67)aA	24	12 (50,00)aA
T2	30	21 (70,00)bA	26	20 (76,00)aA

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

T1 = 20% de gema-de-ovo; T2 = 2,5% de gema-de-ovo.

Os valores de prenhez obtidos nos Experimentos 1 e 2 não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ). No entanto, entre os tratamentos T1 e T2, no Experimento 1, foi observada diferença ( $p < 0,05$ ). Já no Experimento 2 não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos T1 e T2, possivelmente pelo número de animais utilizados. Vale ressaltar ainda que o sêmen utilizado no T1 passou pelo processo de retirada do plasma seminal, apesar do porcentual de prenhez do T2 ter acompanhado o aumento no resultado de prenhez. Outro ponto a ser observado é que Experimento 2 foi realizado dentro da estação reprodutiva fisiológica para a espécie.

#### 4. Conclusão

Mediante as análises seminais realizadas *in vitro* e os resultados obtidos por meio da fertilidade *in vivo*, pode-se concluir que o diluente glicose-EDTA, com uma concentração de 2,5% de gema-de-ovo, pode ser utilizado na conservação do sêmen caprino congelado, independentemente da época do ano.

#### 5. Referências Bibliográficas

ABOAGLA, E. M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-72, 2003.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 2.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2000. 272 p.

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

BARBAS J. P.; MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C. V., PEREIRA, R. M.; CAVACO-GONÇALVES, S.; MASCARENHA, R. M.; NATI P.; COGNIE, Y.; HORTA, A. E. M. Reproduction in the goat Serrana breed:seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, *in vivo* and *in vitro* fertility. In: Animal products from the Mediterranean area. **EAAP Publication**, v. 119, p. 337-342, 2006.

BARBOSA, L. P. **Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina**. Viçosa-MG: UFV, 1999.

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

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

BLOM, E. **The evaluation of bull sêmen with special reference to its use in artificial insemination (trans)**. 1950. 89 p. (Tese, Doutorado em Medicina Veterinária) – Copenhagen: Montensen, 1950.

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

CASTILHO, E. F. **Uso da propólis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008.

CAVALCANTE, T. V. **Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos das raças Bôer e Alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva**. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – UNESP, Jaboticabal-SP, 2003.

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

DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, p. 460-462, 2001.

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, 2007a.

DROBNIS, E. Z.; NELSON, E. A.; BURRILL, M. J. Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat sêmen. I. Diluent. **J. Anim. Sci. Suppl.** v. 51, p. 439, 1980 (Abstract).

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

FASTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 251-260, 1996.

FERRARI, S.; LEINZ, F.; BARNABE, V. H. Inseminação artificial em cabras com sêmen congelado: resultados preliminares. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 5, p. 223-224, 1998.

FRANÇA, M. P. **Inseminação artificial com sêmen congelado de caprino no sertão do estado de Pernambuco**. 59 f. 1981. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, 1981.

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

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of sêmen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-23, 2000.

LA FALCI, V. S. N. *et al.* Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, p. 1035-1048, 2002.

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

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. **Tecnologia da conservação de sêmen caprino e inseminação artificial**. Sobral-CE: EMBRAPA-CNPC, 1988. (Relatório Técnico de Projeto de Pesquisa)

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. Centrifugation of stallion sêmen and its storage en large volume straws. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. 27, p. 47-51, 1979.

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

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

MIES FILHO, A. Regulação natural da reprodução dos animais. **A Hora Veterinária**, v. 52, p. 21-29, 1989.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull sêmen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

PALHÃO, M. P. **Avaliação do sêmen caprino diluído em citrato-gema, resfriado e armazenado a 5°C por 24 horas**. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

PELLICER-RUBIO, M. T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1023-1031, 1997.

RITAR, A. J.; BALL, P. D. O.; MAY, P. J. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, sêmen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, p. 377-84, 1990.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed sêmen of Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 36, p. 49-59, 1983.

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. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 35, p. 305-312, 1982.

RITAR, A.J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 36, n. 1, p. 49-59, 1983.

ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos.** 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

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

SALVADOR, I.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; BERNACER, J.; GOMEZ, E. A.; SILVESTER, M. A. Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina goats: a field assay. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 40, p. 526-9, 2005.

SIQUEIRA, A. P. *et al.* Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema-de-ovo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 61, n. 2, abr. 2009 .

SMITH, A. H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p. 668-671, 1950.

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

SWANSON, W. W. & BEARDEN, H. J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v. 10, p. 981, 1951.

UFV. **SAEG versão 9.0.** Viçosa-MG: UFV, 2005.

## **ANEXO**

## ANEXO A

### Artigo 1

#### Características e taxa de fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5°C por 24 horas, em função das concentrações de gema-de-ovo no diluente

##### Sêmen fresco

###### VOLUME

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	0.7555556	0.3148430	90
BODE	1.	0.8652174	0.2948169	23
BODE	2.	0.8173913	0.3927203	23
BODE	3.	0.7272727	0.2814619	22
BODE	4.	0.6045455	0.2148693	22

###### MOTF

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	87.94444	3.343150	90
BODE	1.	88.47826	2.793980	23
BODE	2.	87.82609	2.948839	23
BODE	3.	86.36364	3.512501	22
BODE	4.	89.09091	3.663320	22

###### VIGORF

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	3.972222	0.3622736	90
BODE	1.	3.934783	0.3472079	23
BODE	2.	4.000000	0.3692745	23
BODE	3.	3.863636	0.3836485	22
BODE	4.	4.090909	0.3322493	22

###### CONCENTRAÇÃO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	1.322222	0.6545635	90
BODE	1.	1.600000	0.8017027	23
BODE	2.	1.313043	0.6538726	23
BODE	3.	1.162727	0.5088379	22
BODE	4.	1.200909	0.5558769	22

HIPOSMÓTICO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	72.78889	7.859002	90
BODE	1.	76.34783	8.009135	23
BODE	2.	74.65217	7.419928	23
BODE	3.	67.77273	7.104203	22
BODE	4.	72.13636	6.475562	22

SUPRAVITAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	78.24444	9.391977	90
BODE	1.	74.65217	7.480938	23
BODE	2.	69.56522	5.671508	23
BODE	3.	82.22727	7.157625	22
BODE	4.	87.09091	5.919372	22

Análise de Variância

VOLUME

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	3	0.8838230	0.2946077	3.192	0.02761
Resíduo	86	7.938399	0.9230697E-01		

Coeficiente de Variação = 40.212

NEWMAN KEULS

Variável = VOLUME (0.9230696E-01)

BODE	Descrição	Dados	Médias	Comparações	5%
1		23	0.8652	A	
2		23	0.8174	AB	
3		22	0.7273	AB	
4		22	0.6045	B	

MOTILIDADE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	3	90.76965	30.25655	2.879	0.04064
Resíduo	86	903.9526	10.51108		

Coeficiente de variação = 3.687

NEWMAN KEULS

Variável = MOTF (10.51108)

BODE	Descrição	Dados	Médias	Comparações	5%
4		22	89.0909	A	
1		23	88.4783	AB	
2		23	87.8261	AB	
3		22	86.3636	B	

VIGOR

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	3	0.6192907	0.2064302	1.605	0.19415
Resíduo	86	11.06126	0.1286194		

Coefficiente de Variação = 9.029

CONCENTRAÇÃO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	3	2.660050	0.8866835	2.150	0.09987
Resíduo	86	35.47231	0.4124687		

Coefficiente de Variação = 48.573

HIPOSMÓTICO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	3	934.0996	311.3665	5.869	0.00108
Resíduo	86	4562.889	53.05685		

Coefficiente de Variação = 10.007

NEWMAN KEULS

Variável = HIPOSF (53.05685)

BODE	Descrição	Dados	Médias	Comparações	5%
1		23	76.3478	A	
2		23	74.6522	A	
4		22	72.1364	AB	
3		22	67.7727	B	

SUPRAVITAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	3	4100.071	1366.690	31.338	0.00000
Resíduo	86	3750.551	43.61106		

Coefficiente de Variação = 8.440

NEWMAN KEULS

Variável = SVF (43.61106)

BODE	Descrição	Dados	Médias	Comparações	5%
4		22	87.0909	A	
3		22	82.2273	B	
1		23	74.6522	C	
2		23	69.5652	D	

### Sêmen resfriado 24 horas a 5°C

#### MOTILIDADE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	73.30556	12.55339	180
TRAT	1.	68.55556	15.49274	90
TRAT	2.	78.05556	5.593658	90

#### VIGOR

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.875000	0.5953146	180
TRAT	1.	2.544444	0.6164617	90
TRAT	2.	3.205556	0.3343150	90

#### SUPRAVITAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	65.28333	15.44219	180
TRAT	1.	59.40000	17.26255	90
TRAT	2.	71.16667	10.56414	90

#### HIPOSMÓTICO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	49.27222	15.49043	180
TRAT	1.	42.26667	15.77354	90
TRAT	2.	56.27778	11.59914	90

## Análise de Variância

### MOTILIDADE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	4013.773	4013.773	30.138	0.00002
BODE	3	901.2774	300.4258	2.256	0.08369
TRAT BODE	3	338.8488	112.9496	0.848	*****
Resíduo	172	22906.82	133.1792		

Coeficiente de Variação = 15.743

### VIGOR

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	19.58235	19.58235	80.214	0.00001
BODE	3	1.480731	0.4935771	2.022	0.11269
TRAT BODE	3	0.2990887	0.9969624E-01	0.408	*****
Resíduo	172	41.98962	0.2441257		

Coeficiente de Variação = 17.186

### SUPRAVITAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	6199.826	6199.826	46.253	0.00001
BODE	3	13309.07	4436.358	33.097	0.00002
TRAT BODE	3	89.94822	29.98274	0.224	*****
Resíduo	172	23055.08	134.0411		

Coeficiente de Variação = 17.734

### HIPO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	8799.474	8799.474	74.495	0.00001
BODE	3	13664.45	4554.817	38.560	0.00002
TRAT BODE	3	136.3304	45.44347	0.385	*****
Resíduo	172	20316.87	118.1214		

Coeficiente de Variação = 22.058

## Fertilidade Sêmen Resfriado

### LOCAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.838235	0.3709727	68
TRAT	1.	2.777778	0.4216370	36
TRAT	2.	2.906250	0.2961446	32

MUCO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.095588	0.4075532	68
TRAT	1.	2.111111	0.3984095	36
TRAT	2.	2.078125	0.4233007	32

PESO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	48.88529	8.097194	68
TRAT	1.	48.57778	8.227553	36
TRAT	2.	49.23125	8.064956	32

SCORE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.974265	0.4449964	68
TRAT	1.	3.013889	0.4469917	36
TRAT	2.	2.929688	0.4455622	32

DURACAOC

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	31.23529	9.070401	68
TRAT	1.	33.33333	9.121403	36
TRAT	2.	28.87500	8.544948	32

## Artigo 2

### Avaliação da fertilidade do sêmen caprino congelado em função das concentrações de gema-de-ovo no diluente

#### Experimento 1: Estação induzida por luz

##### Sêmen fresco

###### VOLUME

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	1.312500	0.4673252	8
BODE	1.	1.575000	0.4349329	4
BODE	2.	1.050000	0.3696846	4

###### MOTILIDADE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	87.50000	2.672612	8
BODE	1.	88.75000	2.500000	4
BODE	2.	86.25000	2.500000	4

###### VIGOR

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	3.875000	0.3535534	8
BODE	1.	3.875000	0.2500000	4
BODE	2.	3.875000	0.4787136	4

###### CONCENTRAÇÃO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	2.296250	1.132342	8
BODE	1.	3.150000	0.9110434	4
BODE	2.	1.442500	0.4670029	4

###### SUPRAVITAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	79.12500	6.010408	8
BODE	1.	82.00000	4.760952	4
BODE	2.	76.25000	6.291529	4

###### DEFEITOS MENORES

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	1.000000	0.9258201	8
BODE	1.	1.000000	1.154701	4
BODE	2.	1.000000	0.8164966	4

DEFEITOS MAIORES

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	1.125000	1.807722	8
BODE	- - - - -	1. 1.750000	2.362908	4
BODE	- - - - -	2. 0.500000	1.000000	4

Análise de Variância

VOLUME

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	0.5512500	0.5512500	3.384	0.11547
Resíduo	6	0.9775000	0.1629167		

Coefficiente de Variação = 30.753

MOTILIDADE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	12.50000	12.50000	2.000	0.20703
Resíduo	6	37.50000	6.250000		

Coefficiente de Variação = 2.857

VIGOR

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
Resíduo	6	0.8750000	0.1458333		

Coefficiente de Variação = 9.855

CONCENTRAÇÃO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	5.831112	5.831112	11.127	0.01569
Resíduo	6	3.144275	0.5240458		

Coefficiente de Variação = 31.526

SUPRAVITAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	66.12500	66.12500	2.124	0.19523
Resíduo	6	186.7500	31.12500		

Coefficiente de Variação = 7.051

DEFEITOS MENORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
Resíduo	6	6.000000	1.000000		

Coefficiente de Variação = 00.000

DEFEITOS MAIORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	3.125000	3.125000	0.949	*****
Resíduo	6	19.75000	3.291667		

Coeficiente de Variação = 161.271

## Sêmen congelado

MOTILIDADE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	60.00000	5.163978	16
TRAT	1.	58.75000	5.175492	8
BODE	1.	60.00000	4.082483	4
BODE	2.	57.50000	6.454972	4
TRAT	2.	61.25000	5.175492	8
BODE	1.	62.50000	6.454972	4
BODE	2.	60.00000	4.082483	4

VIGOR

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.968750	0.3859512	16
TRAT	1.	2.750000	0.3779645	8
BODE	1.	2.875000	0.2500000	4
BODE	2.	2.625000	0.4787136	4
TRAT	2.	3.187500	0.2587746	8
BODE	1.	3.250000	0.2886751	4
BODE	2.	3.125000	0.2500000	4

SUPRAVITAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	60.25000	6.845923	16
TRAT	1.	58.75000	7.573450	8
BODE	1.	58.25000	6.994045	4
BODE	2.	59.25000	9.178780	4
TRAT	2.	61.75000	6.158618	8
BODE	1.	65.00000	6.218253	4
BODE	2.	58.50000	4.654747	4

DEFEITOS MENORES

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	1.375000	1.204159	16
TRAT	1.	2.000000	1.195229	8
BODE	1.	2.500000	1.000000	4
BODE	2.	1.500000	1.290994	4
TRAT	2.	0.750000	0.8864053	8
BODE	1.	0.750000	0.9574271	4
BODE	2.	0.750000	0.9574271	4

DEFEITOS MAIORES

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	3.875000	2.247221	16
TRAT	- - - - -	1. 5.125000	2.295181	8
BODE	- - - - -	1. 5.750000	1.707825	4
BODE	- - - - -	2. 4.500000	2.886751	4
TRAT	- - - - -	2. 2.625000	1.407886	8
BODE	- - - - -	1. 2.500000	1.732051	4
BODE	- - - - -	2. 2.750000	1.258306	4

Análise de Variância

MOTILIDADE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	25.00000	25.00000	0.857	*****
BODE	1	25.00000	25.00000	0.857	*****
TRAT BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
Resíduo	12	350.0000	29.16667		

Coefficiente de Variação = 9.001

VIGOR

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.7656250	0.7656250	7.000	0.02135
BODE	1	0.1406250	0.1406250	1.286	0.27899
TRAT BODE	1	0.1562500E-01	0.1562500E-01	0.143	*****
Resíduo	12	1.312500	0.1093750		

Coefficiente de Variação = 11.140

SUPRAVITAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	36.00000	36.00000	0.744	*****
BODE	1	30.25000	30.25000	0.625	*****
TRAT BODE	1	56.25000	56.25000	1.163	0.30209
Resíduo	12	580.5000	48.37500		

Coefficiente de Variação = 11.544

DEFEITOS MENORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	6.250000	6.250000	5.556	0.03625
BODE	1	1.000000	1.000000	0.889	*****
TRAT BODE	1	1.000000	1.000000	0.889	*****
Resíduo	12	13.50000	1.125000		

Coefficiente de Variação = 77.139

DEFEITOS MAIORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	25.00000	25.00000	6.316	0.02726
BODE	1	1.000000	1.000000	0.253	*****
TRAT BODE	1	2.250000	2.250000	0.568	*****
Resíduo	12	47.50000	3.958333		

Coefficiente de Variação = 51.343

## Fertilidade

### LOCAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.883333	0.3237318	60
TRAT	1.	2.833333	0.3790490	30
TRAT	2.	2.933333	0.2537081	30

### MUCO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.016667	0.2906257	60
TRAT	1.	2.000000	0.1856953	30
TRAT	2.	2.033333	0.3698400	30

### PESO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	50.81667	10.72079	60
TRAT	1.	47.08667	9.095574	30
TRAT	2.	54.54667	11.05980	30

### ESCORE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.866667	0.4024993	60
TRAT	1.	2.875000	0.4488971	30
TRAT	2.	2.858333	0.3576946	30

### TEMPO EM CIO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	31.60000	9.364918	60
TRAT	1.	32.40000	8.996551	30
TRAT	2.	30.80000	9.806402	30

### DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	1.416667	0.4971671	60
TRAT	1.	1.533333	0.5074163	30
TRAT	2.	1.300000	0.4660916	30

### Análise de Variância

#### LOCAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.1500000	0.1500000	1.442	0.23470
Resíduo	58	6.033333	0.1040230		

Coeficiente de Variação = 11.186

MUCO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.1666667E-01	0.1666667E-01	0.195	*****
Resíduo	58	4.966667	0.8563218E-01		

Coeficiente de Variação = 14.511

PESO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	834.7740	834.7740	8.142	0.00598
Resíduo	58	5946.409	102.5243		

Coeficiente de Variação = 19.925

SCORE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.4166667E-02	0.4166667E-02	0.025	*****
Resíduo	58	9.554167	0.1647270		

Coeficiente de Variação = 14.158

TEMPO EM CIO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	38.40000	38.40000	0.434	*****
Resíduo	58	5136.000	88.55172		

Coeficiente de Variação = 29.779

DIAG.

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.8166667	0.8166667	3.441	0.06869
Resíduo	58	13.76667	0.2373563		

Coeficiente de Variação = 34.390

Correlações de Pearson

Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
LOCAL	DIAG.	60	-0.1141	-0.8745	0.1927
MUCO	DIAG.	60	-0.1075	-0.8237	0.2068
PESO	DIAG.	60	-0.0710	-0.5418	0.2950
SCORE	DIAG.	60	-0.0141	-0.1075	0.4574
TEMPOCIO	DIAG.	60	0.3568	2.9083	0.0026

## Experimento 1: Estação fisiológica

### Sêmen fresco

#### VOLUME

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	1.225000	0.1488048	8
BODE	1.	1.325000	0.1258306	4
BODE	2.	1.125000	0.9574271E-01	4

#### MOTILIDADE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	90.00000	3.779645	8
BODE	1.	90.00000	4.082483	4
BODE	2.	90.00000	4.082483	4

#### VIGOR

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	3.812500	0.4580627	8
BODE	1.	3.625000	0.4787136	4
BODE	2.	4.000000	0.4082483	4

#### CONCENTRAÇÃO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	2.587500	0.7395703	8
BODE	1.	3.050000	0.8062258	4
BODE	2.	2.125000	0.2362908	4

#### SUPRAVITAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	87.62500	3.777282	8
BODE	1.	86.50000	4.041452	4
BODE	2.	88.75000	3.685557	4

#### DEFEITOS MENORES

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	1.000000	0.9258201	8
BODE	1.	1.000000	1.154701	4
BODE	2.	1.000000	0.8164966	4

## DMAF

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
BODE	Todos	1.125000	1.807722	8
BODE	- - - - -	1. 1.750000	2.362908	4
BODE	- - - - -	2. 0.500000	1.000000	4

## Análise de Variância

## VOLUME

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	0.800000E-01	0.800000E-01	6.400	0.04469
Resíduo	6	0.750000E-01	0.125000E-01		

Coeficiente de Variação = 9.127

## MOTILIDADE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
Resíduo	6	100.0000	16.66667		

Coeficiente de Variação = 4.536

## VIGOR

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	0.281250	0.281250	1.421	0.27824
Resíduo	6	1.187500	0.1979167		

Coeficiente de Variação = 11.669

## CONCENT

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	1.711250	1.711250	4.849	0.06991
Resíduo	6	2.117500	0.3529167		

Coeficiente de Variação = 22.959

## SUPRAVITAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	10.12500	10.12500	0.677	*****
Resíduo	6	89.75000	14.95833		

Coeficiente de Variação = 4.414

## DEFEITOS MENORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
Resíduo	6	6.000000	1.000000		

Coeficiente de Variação = 100.000

DEFEITOS MAIORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
BODE	1	3.125000	3.125000	0.949	*****
Resíduo	6	19.75000	3.291667		

Coeficiente de Variação = 161.271

**Sêmen congelado**

MOTILIDADE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	57.50000	6.055301	16
TRAT	1.	54.37500	6.232117	8
BODE	1.	51.25000	4.787136	4
BODE	2.	57.50000	6.454972	4
TRAT	2.	60.62500	4.172615	8
BODE	1.	61.25000	4.787136	4
BODE	2.	60.00000	4.082483	4

VIG

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.875000	0.3415650	16
TRAT	1.	2.625000	0.2314550	8
BODE	1.	2.625000	0.2500000	4
BODE	2.	2.625000	0.2500000	4
TRAT	2.	3.125000	0.2314550	8
BODE	1.	3.125000	0.2500000	4
BODE	2.	3.125000	0.2500000	4

SUPRAVITAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	57.06250	7.316363	16
TRAT	1.	56.37500	8.140507	8
BODE	1.	56.25000	9.844626	4
BODE	2.	56.50000	7.593857	4
TRAT	2.	57.75000	6.881653	8
BODE	1.	57.50000	8.266398	4
BODE	2.	58.00000	6.480741	4

DEFMEN

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.687500	1.662077	16
TRAT	1.	2.250000	1.488048	8
BODE	1.	2.500000	1.732051	4
BODE	2.	2.000000	1.414214	4
TRAT	2.	3.125000	1.807722	8
BODE	1.	3.250000	1.258306	4
BODE	2.	3.000000	2.449490	4

## DEFMAI

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	3.625000	1.627882	16
TRAT	- - - - -	1. 4.750000	1.488048	8
BODE	- - - - -	1. 5.250000	1.500000	4
BODE	- - - - -	2. 4.250000	1.500000	4
TRAT	- - - - -	2. 2.500000	0.7559289	8
BODE	- - - - -	1. 2.000000	0.000000	4
BODE	- - - - -	2. 3.000000	0.8164966	4

## Análise de Variância

## MOTILIDADE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	156.2500	156.2500	6.000	0.03063
BODE	1	25.00000	25.00000	0.960	*****
TRAT BODE	1	56.25000	56.25000	2.160	0.16737
Resíduo	12	312.5000	26.04167		

Coeficiente de Variação = 8.875

## VIGOR

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	1.000000	1.000000	16.000	0.00176
BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
TRAT BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
Resíduo	12	0.7500000	0.6250000E-01		

Coeficiente de Variação = 8.696

## SUPRAVITAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	7.562500	7.562500	0.114	*****
BODE	1	0.5625000	0.5625000	0.008	*****
TRAT BODE	1	0.6250000E-01	0.6250000E-01	0.001	*****
Resíduo	12	794.7500	66.22917		

Coeficiente de Variação = 14.262

## DEFEITOS MENORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	3.062500	3.062500	0.974	*****
BODE	1	0.5625000	0.5625000	0.179	*****
TRAT BODE	1	0.6250000E-01	0.6250000E-01	0.020	*****
Resíduo	12	37.75000	3.145833		

Coeficiente de Variação = 65.996

## DEFEITOS MAIORES

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	20.25000	20.25000	15.677	0.00190
BODE	1	0.000000	0.000000	0.000	*****
TRAT BODE	1	4.000000	4.000000	3.097	0.10389
Resíduo	12	15.50000	1.291667		

Coeficiente de Variação = 31.352

## Fertilidade

### LOCAL

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.882353	0.3253957	51
TRAT	1.	2.826087	0.3875534	23
TRAT	2.	2.928571	0.2622653	28

### MUCO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.039216	0.3441386	51
TRAT	1.	2.021739	0.1832944	23
TRAT	2.	2.053571	0.4375709	28

### PESO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	50.00196	10.33666	51
TRAT	1.	49.83478	10.27988	23
TRAT	2.	50.13929	10.56950	28

### SCORE

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	2.852941	0.3910769	51
TRAT	1.	2.913043	0.3960651	23
TRAT	2.	2.803571	0.3870421	28

### TEMPOCIO

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TRAT	Todos	31.52941	9.283002	51
TRAT	1.	32.86957	9.720196	23
TRAT	2.	30.42857	8.933618	28

### Análise de Variância

#### LOCAL

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.1326270	0.1326270	1.259	0.26729
Resíduo	49	5.161491	0.1053365		

Coeficiente de Variação = 11.260

## MUCO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.1279534E-01	0.1279534E-01	0.106	*****
Resíduo	49	5.908773	0.1205872		

Coefficiente de Variação = 17.029

## PESO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	1.170844	1.170844	0.011	*****
Resíduo	49	5341.159	109.0032		

Coefficiente de Variação = 20.880

## SCORE

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	0.1513290	0.1513290	0.989	*****
Resíduo	49	7.495730	0.1529741		

Coefficiente de Variação = 13.709

## TEMPOCIO

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	1	75.24004	75.24004	0.871	*****
Resíduo	49	4233.466	86.39726		

Coefficiente de Variação = 29.480

## Correlação de Pearson

Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
LOCAL	RESULTAD	51	0.0150	0.1049	0.4584
MUCO	RESULTAD	51	-0.0248	-0.1736	0.4315
PESO	RESULTAD	51	0.0840	0.5904	0.2788
SCORE	RESULTAD	51	0.0421	0.2948	0.3847
TEMPOCIO	RESULTAD	51	0.4128	3.1724	0.0013