

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TESTOSTERONA E FERTILIDADE DE
MACHOS CAPRINOS DAS RAÇAS BOER E ALPINA DURANTE AS ESTAÇÕES,
REPRODUTIVA E NÃO REPRODUTIVA”**

**Tânia Vasconcelos Cavalcante
Médica Veterinária**

**Jaboticabal- São Paulo- Brasil
Dezembro de 2003**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TESTOSTERONA E FERTILIDADE DE
MACHOS CAPRINOS DAS RAÇAS BOER E ALPINA DURANTE AS ESTAÇÕES,
REPRODUTIVA E NÃO REPRODUTIVA”**

Tânia Vasconcelos Cavalcante

Orientador: Prof. Dr. Cesar Roberto Esper

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Veterinárias e Agrárias, UNESP *Campus* de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, Área de Concentração em Reprodução
Animal.**

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Dezembro de 2003

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Tânia Vasconcelos Cavalcante nascida em 06 de Março de 1964, na cidade de Fortaleza-CE, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI em Março de 1990. Trabalhou como Médica Veterinária autônoma dando assistência técnica aos criadores de caprinos e ovinos do estado do Piauí até o primeiro semestre de 1992. Em agosto de 1992 iniciou o Curso de Especialização em Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará, concluído em 1993, e de Mestrado em 1996, concluído em Outubro de 1998. Neste ano ingressou, mediante concurso público, como professora substituta, na Escola Superior de Agricultura de Mossoró- RN. No ano seguinte, ministrou a disciplina Caprino-ovinocultura na Universidade do Tocantins. No ano de 2000, após seleção, ingressou no curso de Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal, na UNESP- Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, *Campus* de Jaboticabal. Em Maio de 2003, ingressou mediante concurso público como docente na Universidade Federal do Tocantins – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Araguaína, onde atualmente ministra a disciplina de Fisiopatologia da Reprodução.

...De minha parte, hei de debruçar à margem do rio, E dizer:

- o que tinha de ser feito

Está feito

... Se vai voar ou não, bem alto ou não, e para aonde

É outra história

Não peço que devolvam nada, eu que nada tinha

A flor sabe o que dela se espera

Já nós...

Uns reclamam, tantos protestam, os melhores reivindicam

Aonde vais que a pressa te atordoa

O mundo mora onde era preciso

Prof. Dr. Nicodemos Alves de Macedo (UFPI)

DEDICO

Aos meus pais, **João Afonso** (*in memoriam*) e **Maria do Carmo**, pelo amor, incentivo e confiança sempre depositados em mim

Aos meus irmãos, **Júnior** e **Tatiana**, pelos dias inesquecíveis convividos na nossa infância

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças, coragem e vontade de lutar e vencer.

Ao Prof. Dr. César Roberto Esper pela orientação, confiança e incentivo neste trabalho, bem como pela sua amizade.

Aos amigos Hymerson Costa Azevedo, Mabel Freitas Cordeiro e Fabíola Christian de Carvalho pela ajuda constante, paciência e dedicação presentes.

Ao Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo pelo apoio e colaboração na parte experimental deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Heraldo César Gonçalves e senhor Hélio Duarte pelo empréstimo dos animais.

A profa. Silvana Bartoni pela amizade, simpatia e empréstimo do Digitalizador de imagens Image pro-plus

À Profa. Dra. Eunice Oba pela amizade, apoio e realização da dosagem hormonal.

Ao Prof. Resende (UFBA) pelo apoio e ensinamento no processo de congelação do sêmen.

Ao Prof. Dr. José Adalmir Torres de Sousa (UFPI) e sua equipe pela realização da inseminação artificial.

Aos colegas da pós-graduação, Sandra Helena Gabaldi, Alexandre Wolf, Ricarda dos Santos, Karina Belotti, Simone Méo, Lourivaldo Paes Landin, André Buck, Marcelo Zocolaro, EriKa Maroni, Marcelo Roncoletta, Antônio Martinez, Cassiana Abreu, Gerson Azeredo, Luís Carlos Pacheco, Marcelo Seneda, Christina Ramirez, Walt Yamazaki, Sara Tomita, Simone Sousa, Eric e Viviane Caiado, Letícia, Edson LoTurco, Max Resende, Ivo Walter, Felipe Perecin, Kleber Ancito, Caliê Castilho, Andréa Basso, Jacira e Carlo Torreão pelo companheirismo e convivência inesquecível durante o curso.

As amigas da República “Cangaceiras”, Maria de Jesus Veloso, Mônica Carneiro e katyane Almeida pelos longos dias de convivência, tolerâncias e aprendizado. Em

especial Hinig Isa (Tuti) que me acolheu com atenção e carinho no momento de chegada.

A amiga-irmã Francisca Elda Ferreira Dias por tudo que ela representa incondicionalmente: sinceridade, lealdade e amizade.

As colegas Isolda Márcia Rocha, Denise Tavares, Tatiana Braganholo e Fabiana Lucena pela atenção, carinho e ajuda nas leituras das lâminas.

Aos funcionários Isabel Penariol, Roberta Vantini, Ivo Luís Almeida Júnior e Paulo Sérgio da Silva do *Campus* de Jaboticabal e ao Anivaldo José da Silva (Xita) de Botucatu por toda atenção e ajuda dispensada.

A Coordenadoria de Apoio a Pesquisa de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. E a Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização experimental.

À Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Botucatu, através da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária por ceder laboratórios para realização parte experimental deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Campus* de Jaboticabal, através da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade de formação, e pela atuação de seus docentes e funcionários.

Aos colegas docentes da Universidade Federal do Tocantins - UFT - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Araguaína pelo apoio, incentivo e liberação para a conclusão do doutorado.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Características reprodutivas da espécie caprina.....	2
2.2 Alterações causadas nos espermatozóides devido a criopreservação...	6
2.3 Testes <i>in vitro</i> para a avaliação da fertilidade.....	9
2.4 Avaliação computadorizada da motilidade e morfometria espermática.....	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Geral.....	12
3.2 Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODO	13
4.1 Animais e Tratamentos.....	13
ETAPA I	14
4.2 Colheita do sêmen.....	14
4.3 Avaliação das características físicas do sêmen.....	14

4.4 Morfologia espermática.....	15
4.5 Congelação do sêmen.....	15
4.6 Descongelção do sêmen.....	16
4.7 Testes para predição da fertilidade.....	16
4.7.1 Integridade do DNA: avaliação pelo Método do Acridine Orange.....	16
4.7.2 Avaliação dos parâmetros da motilidade espermática computadorizada (CASA)	17
4.7.3 Morfometria da cabeça espermática.....	17
4.7.4 Atividade Mitocondrial – Atividade Citoquímica.....	18
4.7.5 Integridade da membrana plasmática com sondas fluorescentes.....	19
4.8 Colheitas das amostras de sangue.....	20
ETAPA 2	21
4.9 Sincronização de estro.....	21
4.10 Inseminação Artificial.....	21
4.11 Análise Estatística.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Avaliação das características do sêmen.....	23
5.2 Morfologia espermática.....	27
5.3. Testes para Predição da Fertilidade	30
5.3.1 Integridade do DNA: avaliação pelo “Método Acridine Orange”	30

5.3.2 Avaliação dos parâmetros da motilidade espermática computadorizada (CASA).....	34
5.3.3 Morfometria da cabeça espermática.....	45
5.3.4 Atividade Citoquímica.....	49
5.3.5 Integridade da membrana plasmática do espermatozóide com sondas fluorescentes.....	52
5.4 Dosagens da testosterona plasmática.....	56
5.5 Sincronização do estro.....	58
5.6 Inseminação Artificial.....	59
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	62
8. APÊNDICE.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Valores médios e desvios padrões (\pm) do volume (Vol), turbilhonamento (Tur), concentração espermática (Conc/mL), motilidade e vigor de ejaculados caprinos das raças Boer e Alpina colhidos no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002.....	24
2. Valores médios e desvios padrões (\pm) da morfologia espermática (defeitos maiores, menores e total - %) de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002.....	28
3. Freqüências de espermatozóides (sptz) normais (cor verde) e danificados (cor alaranjada) (método acridine orange) nas amostras pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD) de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e na primavera, Botucatu-SP, 2002.....	31
4. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para os parâmetros da motilidade dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita e pós-descongelção, utilizando-se análises computadorizadas (Computer Assisted Semen Analyses, CASA), Botucatu-SP, 2002.....	35
5. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para os parâmetros da motilidade dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono e na primavera, utilizando-se análises computadorizadas (Computer Assisted Semen Analyses, CASA), Botucatu-SP, 2002.....	36

6. Médias ajustadas por quadrados mínimos para a morfometria (μm) digitalizada (Image Pro-plus) da cabeça do espermatozóide caprino das raças Boer e Alpina, pós-colheita e pós-descongelção, Botucatu-SP, 2002..... 46
7. Médias ajustadas por quadrados mínimos para a morfometria (μm) digitalizada (Image Pro-plus) da cabeça do espermatozóide caprino, das raças Boer e Alpina, no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002..... 46
8. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para o número de espermatozóides e índice de atividade citoquímica (IAC), por classes, de acordo com HRUDKA (1987), avaliadas no sêmen caprino, pós-colheita e pós-descongelção, das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002..... 49
9. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para o número de espermatozóides e índice de atividade citoquímica (IAC), por classes de acordo com HRUDKA (1987), avaliadas no sêmen caprino das raças Boer e Alpina, no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002..... 50
- 10 Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para integridade da membrana plasmática de espermatozóides caprinos, por categorias, pós colheita e pós-descongelção, das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002..... 53
11. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para integridade da membrana plasmática de espermatozóides caprinos, por categorias, outono e primavera, das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002..... 53

12. Concentrações plasmáticas médias (\pm ep) de Testosterona em caprinos das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002..... 56
13. Concentrações plasmáticas médias (\pm ep) de Testosterona em caprinos no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002..... 56
14. Taxa de fertilidade (%) de fêmeas Sem Raça Definida (SRD) inseminadas com sêmen congelado de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e na primavera, São Mateus-MA, 2002..... 59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Coloração pela técnica “acridine orange” mostrando espermatozóides normais, sem DNA danificado (fluorescência verde). Imagem digitalizada. Aumento 1000x.....	33
2. Coloração pela técnica “acridine orange” mostrando espermatozóides anormais, com DNA danificado (cor alaranjada). Imagem digitalizada. Aumento de 1000x.....	33
3. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos para motilidade total e progressiva dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P < 0,01$).....	37
4. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos para motilidade total e progressiva dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P > 0,01$).....	37
5. Médias e desvios padrões ajustados ($\mu\text{m}/\text{seg}$) por quadrados mínimos para velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($p < 0,01$).....	38

6. Médias e desvios padrões ajustados ($\mu\text{m}/\text{seg}$) por quadrados mínimos para velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) de espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($p>0,01$)..... 38
7. Médias e desvios padrões ajustados (μm) por quadrados mínimos da amplitude lateral da cabeça (ALH) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós- descongelação (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($p>0,01$)..... 39
8. Médias e desvios padrões ajustados (μm) por quadrados mínimos da amplitude lateral da cabeça (ALH) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono(Out) e na primavera(Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($p>0,01$)..... 39
9. Médias e desvios padrões ajustados (Hz) por quadrados mínimos da frequência de batimentos (BCF) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita e pós-descongelação, utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($p<0,01$)..... 40
10. Médias e desvios padrões ajustados (Hz) por quadrados mínimos da frequência de batimentos (BCF) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P<0,01$)..... 40

11. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da retilinearidade (STR) dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P>0,01$)..... 41
12. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da retilinearidade (STR) dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($p>0,01$)..... 41
13. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da linearidade (LIN) dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P>0,01$)..... 42
14. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da linearidade (LIN) dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P>0,01$)..... 42
15. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da velocidade rápida dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P<0,01$)..... 43

16. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da velocidade rápida dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P>0,01$)..... 43
17. Espermatozóides caprinos corados com hematoxilina (imagem digitalizada) .Aumento 1000x..... 48
18. Espermatozóides caprinos corados com DAB. Categoria 1 – Mitocôndrias ativas; 2. Mitocôndrias ativas > inativas; 3. Mitocôndrias ativas < inativas; Mitocôndrias inativas; Aumento de 1000x..... 51
19. Espermatozóides corados com combinação DIC e IP. (1) Íntegros; (2,3) Parcialmente danificado; (5) Lesados. Aumento de 1000x..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS

AAG	Ácido acético glacial
ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Caprinos
ACIN	Solução a base de água de coco
ALH	Amplitude lateral da cabeça
AO	Acridine orange
BCF	Frequência de batimentos
CASA	Computer assisted semen analyses
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
Conc	Concentração
DAB	Diaminobenzidine
DIC	Diacetato de carboxifluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
d.p	Desvio padrão
e.p	Erro padrão
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
h	hora
IAC	Índice de atividade citoquímica
IP	Iodeto de propídio
LIN	Linearidade
Min	Minuto
M	Molar
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
MAP	Medroxiprogesterona
MS	Matéria seca

N	Número de animais
NP	Não prenhe
PC	Pós-colheita
PD	Pós-descongelamento
PBS	Phosphate buffered saline
P	Prenhe
VAP	Velocidade de trajeto
VSL	Velocidade progressiva
VCL	Velocidade curvilínea
R	Velocidade rápida
RIA	Radioimunoensaio
Sptz	Espermatozóide
SRD	Sem raça definida
STR	Retilinearidade
Vol	Volume
Tur	Turbilhamento
UI	Unidade internacional

CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TESTOSTERONA E FERTILIDADE DE MACHOS CAPRINOS DAS RAÇAS BOER E ALPINA DURANTE AS ESTAÇÕES, REPRODUTIVA E NÃO REPRODUTIVA

RESUMO

Avaliou-se a influência das estações reprodutiva e não reprodutiva *in vivo* sobre a fertilidade e *in vitro* a qualidade do sêmen de caprinos das raças Boer e Alpina em duas etapas. A primeira foi conduzida na FMVZ - Botucatu e FCAV Jaboticabal. Selecionou-se nove caprinos das raças Boer e Alpina mantidos em criação intensiva e sob luminosidade natural. Estudou-se as características seminais, congelabilidade do sêmen, e testes para predição da fertilidade como: integridade do DNA, análises computadorizadas da motilidade e morfometria espermática, avaliação da peça intermediária e a integridade de membrana de 71 ejaculados no outono e 64 na primavera. Amostras de sangue foram colhidas nas duas estações, para mensuração da testosterona plasmática. Na segunda etapa, 164 cabras SRD foram inseminadas com o sêmen colhido na primeira etapa. Aplicou-se ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer para cada uma das variáveis, teste T de Student e qui-quadrado. Nas características seminais, observaram-se diferenças estatísticas ($P < 0,01$) para o volume e concentração espermática. A morfologia espermática apresentou-se dentro da normalidade. As taxas de fertilidade para as fêmeas inseminadas foram 26,74, 19,77 e 34,62 e 29,49, com sêmen colhido no outono e primavera, para as raças Boer e Alpina, respectivamente. Não houve diferença de fertilidade dos machos. Os testes de fertilidade mostraram que a integridade da cromatina apresentou menos de 10% de espermatozoides danificados. A motilidade espermática, os índices de atividade citoquímica e a integridade de membrana plasmática diferiram estatisticamente ($P < 0,01$) nas amostras pós-colheita e pós-descongelamento, entretanto, sem diferença entre as estações. A morfometria da cabeça e a quantificação de testosterona não apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre as amostras. Concluiu-se que caprinos das raças Boer e Alpina, não diferiram quanto à fertilidade quando usados para inseminação artificial, no outono e primavera.

Palavras-chave: caprino, sêmen, fertilidade, estação do ano.

THE PLASMATIC TESTOSTERONE CONCENTRATIONS AND FERTILITY OF MALES GOATS BOER AND ALPINE BREED DURING BREEDING AND NON- BREEDING SEASON

ABSTRACT

The season breeding and non-breeding influence on *in vivo* and *in vitro* fertility of Boer and Alpine Bucks was evaluated two steps. The first was conducted at FMVZ – Botucatu and FCAV – Jaboticabal. Nine bucks of Boer and Alpine breed were selected and kept under intensive production regimen and natural luminosity. The seminal characteristics, freezing and fertility prediction tests was evaluated using: DNA integrity, sperm motility computer analysis, head morphometric, middle piece evaluation and membrane integrity of 71 ejaculates on autumn and 64 on spring. Blood samples were collected in both for seasons to measurement of plasmatic testosterone (PT). In second step, 164 female goats, without defined breed, were insemination with the semen collected in the first step. ANOVA was applied followed by the Tukey-Kramer multiple comparison tests for each of the characteristics. T-Student and Chi-square tests were performed and for PT and fertility rate (FR). For seminal characteristics evaluation, statistical differences ($P < 0.01$) were observed for volume and concentration. The spermatic morphological analysis showed normal patterns. The FR for pregnancy were 26.74, 19.77, 34.62 and 29.49, for semen that was collected in Autumn and Spring, to Boer and Alpine breeds respectively. There was no difference in males' fertility. Prediction fertility tests showed less than 10% of damaged spermatozoon on chromatin integrity evaluation. Spermatic motility parameters, citochemistry activity rates and integrity membrane plasmatic were statistically different ($P < 0.01$) in samples after-collection and after-thawing, however, between seasons differences were not seen. The head morphometry and the testosterone quantification did not show statistical differences ($P > 0.01$) between the samples. It was concluded that Boer and Alpine breeds did not differ in fertility, when used for artificial insemination, in Autumn and Spring

Key words: goat, semen, fertility, season.

1. INTRODUÇÃO

Os caprinos desde sua domesticação há 9.000 anos, espalharam-se por todos os continentes entre latitudes equatoriais e árticas, desenvolvendo-se tanto em zonas úmidas quanto em zonas áridas (BROWN & RESTALL., 1996). Em países em desenvolvimento, sua exploração consiste basicamente na produção de carne e pele. Apesar de 94,6% do efetivo mundial localizar-se em países tropicais e subtropicais com a produção de leite nesses rebanhos ainda muito baixa (BARIL et al., 1993).

A alta eficiência reprodutiva de um rebanho é o reflexo de um conjunto de fatores, tais como: nutrição, manejo, bem como, o potencial reprodutivo do animal, o que torna o controle destes componentes de extrema importância para a maximização da produção. Há que se considerar a influência do fotoperíodo, uma vez que estes parâmetros são válidos para ambos os sexos, sendo o macho merecedor de maior atenção, pois tem participação mais efetiva, devido ao seu poder multiplicador de fatores genéticos.

A relação entre a qualidade do sêmen e a fertilidade têm sido investigada em diversas espécies domésticas, com o objetivo geral de prever a fertilidade baseada nas características seminais. Como são muitos os fatores que afetam a qualidade do sêmen, além dos métodos tradicionais, atenção especial tem sido voltada para as análises computadorizadas dos parâmetros seminais.

É requisito imprescindível para se classificar um animal um reprodutor, poder-se prever seu o potencial fertilização. Portanto, um estudo sobre a influência da variação estacional nas características do sêmen e uma avaliação da fertilidade de reprodutores caprinos das raças Boer e Alpina em muito contribuiria na seleção de animais com alto poder reprodutivo, elevando, assim, a capacidade de multiplicação e produção de criatórios no sudeste brasileiro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características reprodutivas da espécie caprina

O macho caprino apresenta certa estacionalidade produtiva que depende de uma série de variáveis. Estas variáveis podem ser de ordem intrínseca, destacando-se a raça, o peso e a idade; e as extrínsecas, fotoperíodo, latitude, temperatura e alimentação (NUNES et al., 1997).

A duração do fotoperíodo (luz do dia) parece constituir o principal fator a condicionar a estacionalidade reprodutiva (PHILLIPS et al., 1943 apud ESPESCHIT, 1998). A luz recebida pela retina dos olhos é conduzida pelo nervo óptico que envia uma mensagem até a glândula pineal, por meio de estímulo nervoso. Essa, na ausência de luz no meio ambiente, produz a melatonina que, por sua vez, estimula o hipotálamo, a hipófise e os ovários ou testículos ao retorno da atividade reprodutiva (TRALDI, 1994).

Alterações nas características do sêmen e na libido de carneiros e bodes de diferentes raças, devido a variações estacionais, são assinaladas por diversos pesquisadores. As causas destas alterações residem, em grande parte, nos diferentes fatores componentes do clima, como evidenciam trabalhos efetuados com respeito à luminosidade e à temperatura e do regime de chuvas (NUNES, 1982). A amplitude desta variação sazonal muda substancialmente de acordo com o rebanho e individualidade do macho, e representa a sensibilidade de cada animal ou rebanho para os fatores do meio (MANDIKI et al., 1998).

A duração da estação de acasalamento varia inversamente com a latitude, aumentando quando a latitude é menor, apresentando os rebanhos caprinos de média e alta latitude (mais alta que 35°) marcada sazonalidade (LEBOEUF et al., 2000).

É bem conhecido que o tamanho do testículo, assim como a eficiência da espermatogênese de ovinos e caprinos está no seu nível máximo durante a estação de acasalamento e diminui durante a estação não reprodutiva (COLAS et al., 1990). Rebanhos sazonais demonstram que a variação na secreção de testosterona é correlatada à estação de acasalamento (FUENTES et al., 1998). Em carneiros,

concentrações de testosterona estão altas durante a estação de monta e baixas fora desta (LINCOLN et al., 1990).

Dados demonstram que carneiros da raça Manchego são animais de acasalamento contínuo e capazes de produzirem sêmen de qualidade todo o ano. Entretanto, está bem estabelecido que no carneiro, o ciclo anual de involução dos testículos está ligado à concentração de testosterona no sangue (LINCOLN et al., 1990.; LANGFORD & SHRESTHA, 1991). O aumento da secreção de testosterona como resultado do estímulo sexual foi bem estabelecido para touros (KATANGOLE et al., 1971), carneiros (GONZALEZ et al., 1988) e bodes (MATEOS & ZUBIETA., 1990). A presença de fêmeas em estro, perante o macho, aumenta a secreção de LH e um aumento correspondente no nível sérico de testosterona (LLANO & MATEOS-REX, 1994).

A secreção de testosterona é estimulada por gonadotrofinas hipofisárias e é modulada via fator de liberação (LHRH) do hipotálamo (FUENTES et al., 1998). Variações no nível deste hormônio estão associadas com mudanças do fotoperíodo e estas flutuações nas concentrações de testosterona são responsáveis por diferenças sazonais na produção de espermatozóides e composição da secreção das glândulas sexuais acessórias e, por esta razão, na qualidade do sêmen (BORQUE, 1991; BORQUE e SAGÜES, 1992; BORQUE et al., 1992; BORQUE & SAGÜES, 1993). As variações estacionais da concentração plasmática de testosterona acompanham as ocorridas na composição do plasma seminal de caprinos, enquanto a concentração plasmática de frutose, em estação não sexual de machos é quase igual àquela observada em animais castrados (NUNES, 1982).

As glândulas vesiculares secretam a quase totalidade da frutose. A média anual da produção na estação sexual é 1039 mg/100mL de plasma seminal, porém, a média da produção na estação não sexual é 304, 8mg/100mL de plasma seminal (IRITANI & NISHIKAWA, 1964). As concentrações em ácido cítrico, ácido láctico e proteínas do plasma seminalcaprino são significativamente mais elevadas na estação sexual do que fora da mesma (IRITANI et al., 1964).

Experimentos com variação sazonal da capacidade de fertilização de sêmen congelado de carneiro (IRITANI, 1980) demonstraram que a fertilidade de ovelhas foi maior com sêmen obtido e congelado no outono do que aquele na primavera, embora este tenha quase a mesma viabilidade que o congelado no outono. ZLATAREV et al. (1996), estudando a influência da estação no processo reprodutivo, obtiveram o mesmo resultado. De acordo com PINEDA (1989) a atividade metabólica do espermatozóide e a sua capacidade de sobreviver à congelação apresentavam variações relacionadas com a estação.

Espécies de animais de atividade sexual estacional, como o caso dos caprinos e ovinos, podem apresentar problemas relacionados com a criopreservação de ejaculados recolhidos fora da estação reprodutiva (CORTEEL & PAQUIGNOM, 1984); problemas que poderiam estar associados com variações qualitativas e ou quantitativas de algum componente bioquímico seminal, imprescindível na época da reprodução (BORQUE et al., 1992).

As características do sêmen dos reprodutores Alpinos, Saanen e Damascus, nascidos e criados no norte da Grécia (40°, 37' N, 22°, 58' L) mostraram significativas variações sazonais quantitativas (volume, número total de espermatozoides por ejaculado) e qualitativas (porcentagem de espermatozoides vivos, motilidade progressiva espermática e porcentagem de espermatozoides anormais). O melhor sêmen foi produzido durante o final do verão e outono (estação de acasalamento). Contudo, a magnitude desses efeitos sazonais não foi suficiente para evitar que os reprodutores fossem usados para acasalamento ao longo do ano. Entretanto, a presença de diferenças entre as características de sêmen, tornaram necessárias avaliações com bases individuais a fim de selecionar os melhores machos e otimizar a performance reprodutiva (KARAGIANNIDIS et al., 2000).

A análise do sêmen é o método mais utilizado para estimar o potencial de fertilidade de um macho. Os resultados destas provas são para se tomar decisões importantes relacionadas com a inseminação artificial e com a monta natural, com a fertilização *in vitro* ou com a criopreservação do próprio sêmen. A maioria dos trabalhos realizados neste campo tem se dirigido a estudar características seminais tais como:

volume do ejaculado, concentração e motilidade espermática para estabelecer sua relação com a fertilidade (BORQUE et al., 1993).

O conhecimento do potencial de fertilidade de um macho deve ser um requisito imprescindível para sua classificação como doador de sêmen (BORQUE, 1991). Para realizar esta prova *in vivo* tem que se esperar o nascimento dos indivíduos gerados por ele, podendo levar a perda de tempo e aumento dos custos relacionados com o processo de produção animal (BORQUE & NAVARIDAS, 1992).

Na prática, tem se comprovado que a maioria dos machos submetidos à produção de doses seminais com vistas à sua utilização na inseminação artificial, apresenta importante variação na fertilidade individual, embora mantendo valores de volume de ejaculado, concentração e motilidade espermática semelhantes (BORQUE & SAGÜES, 1993).

A classificação morfológica de espermatozóides tornou-se parte integral da análise de sêmen em várias espécies. Uma morfologia espermática pobre é um importante indicador da diminuição da fertilidade em numerosas espécies, incluindo a caprina, bovina, eqüina, e homem. Um aumento no número das anormalidades espermáticas em caprinos tem sido associado com doença, estresse térmico e sazonalidade (GRAVANCE et al., 1995).

2.2 Alterações causadas nos espermatozóides devido à criopreservação

A temperatura altera a organização dos componentes estruturais da membrana plasmática, afetando as suas propriedades, estando associada às mudanças na permeabilidade e habilidade de sofrer fusão. Ainda, os espermatozóides podem apresentar edemas e rupturas nas membranas plasmática e acrossomal externa, mudanças na fluidez, desregulação no influxo de cálcio intracelular e alterações na atividade enzimática (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

A integridade da membrana plasmática reflete na viabilidade do espermatozóide e pode ser avaliada com a coloração dupla de membrana com o corante ácido nucléico permanente (SYBR-14) combinado com o corante iodeto de propídio. É uma técnica rápida e precisa de avaliação do estado funcional do espermatozóide (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

JANUSKAUSKAS et al. (1999) avaliaram a integridade pela coloração SYBR-14 e iodeto de propídio pela técnica de citometria de fluxo e microscopia epifluorescente, não encontrando diferenças significativas entre os métodos utilizados.

Vários métodos usados para avaliar o processo de capacitação espermática envolvem mudanças na composição e organização da bicamada da membrana e na regulação do cálcio intracelular. As membranas geralmente afetadas pela criopreservação são a plasmática, a acrossomal externa e a mitocondrial. A desestabilização da membrana plasmática após a congelação assemelha-se à capacitação fisiológica do espermatozóide. Desde que capacitado e ou acrossoma reagido, o espermatozóide tem uma vida limitada, reduzindo a fertilidade (WATSON, 1995; JANUSKAUSKAS et al., 1999).

A coloração do espermatozóide com clortetraciclina fluorescente (CTC) é utilizada para visualizar o processo de capacitação e reação acrossomal no resfriamento e na congelação. Ainda, a fluoresceína conjugada à lectina (*Pisum sativum agglutin* – FITC-PSA) pode mostrar a coloração seletiva do acrossomo no bovino em quatro padrões vivo com o acrossomo intacto, morto com o acrossomo intacto, vivo com reação acrossomal e morto com reação acrossomal (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

A criopreservação pode produzir uma subpopulação com menor tempo de vida *in vivo*, reduzindo efetivamente a eficiência da população como um todo. Após a criopreservação, os espermatozóides sobreviventes contêm mais cálcio intracelular que antes, refletindo em dano à membrana no mecanismo de permeabilidade seletiva (BAILEY et al., 2000).

Há vários métodos para se detectar a reação acrossomal: microscopia de diferencial de fase, coloração e microscopia de luz, microscopia epifluorescente, anticorpos monoclonais e, a mais moderna, a citometria de fluxo (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

A interrupção da capacitação e ou reação acrossomal pode comprometer o potencial de fertilização do espermatozóide, que por algumas observações da taxa de fertilidade de sêmen criopreservado *in vivo* são correlacionadas com a habilidade do espermatozóide em moderar os níveis de cálcio intracelular (BAILEY et al., 2000).

A criopreservação causa em espermatozóides humanos um aumento na concentração de cálcio intracelular e perda de receptores de progesterona com a lesão a membrana plasmática, ambos contribuindo com a redução da fertilidade após a congelação do sêmen (McLAUGHLIN & FORD, 1994).

Há estudos que reconhecem que a cromatina espermática é um material dinâmico e potencialmente capaz de ser influenciado pela criopreservação (WATSON, 1995). A resistência do espermatozóide à desintegração do DNA é um parâmetro importante na fertilidade (TEJADA et al., 1984). O dano ao DNA pode ser investigado pelos testes de COMET ou de coloração do núcleo avaliado por microscopia epifluorescente ou por citometria de fluxo (WATSON, 2000). Resultados da fluorescência com Acridine Orange na coloração de sêmen mostraram ser este importante indicador no potencial de fertilização de espermatozóide humano, e os testes com este corante em amostras de sêmen surgem como procedimento prático e clinicamente significativo para determinar a qualidade do sêmen durante investigações de infertilidade (TEJADA et al., 1984).

GRAVANCE et al. (1997) não encontraram diferenças significativas na variabilidade das dimensões morfométricas da cabeça do espermatozóide de machos

caprinos de sêmen fresco e congelado. Concluíram que a criopreservação do sêmen caprino não afetava as dimensões morfométricas da cabeça do espermatozóide. No entanto, GRAVANCE et al. (1998b) avaliaram sêmen diluído e congelado de 18 touros quanto à morfometria da cabeça espermática (largura, comprimento, largura x comprimento), área e perímetro de 200 espermatozoides por amostra. Em todos os animais observaram que as cabeças das células congeladas apresentavam-se menores que o diluído. Não conclui em se a relação da redução da morfometria da cabeça poderia ser atribuída à exocitose do acrossomo ou à sobrecondensação da cromatina nuclear. Sugeriram mais estudos para a averiguação do fato para se poder associar à fertilidade.

RITAR & SALAMON (1991) objetivando examinar a sobrevivência de espermatozóide de caprinos da raça Angorá após a diluição com TRIS e congelação em palhetas, a cada mês, de março a agosto, durante a estação de acasalamento no hemisfério sul, observaram que a deterioração do espermatozóide durante os seis meses de estocagem a -196°C e taxa de declínio na viabilidade, foi similar na presença ou ausência de gema de ovo, e se o plasma estava presente (não lavado) ou não (lavado), antes e depois da diluição e congelação. Isto se deve ao fato que na espécie caprina a existência de uma enzima no plasma, secretada pelas glândulas bulbouretrais, a Lecitinase tipo A, que interage com os fosfolipídios do diluidor e liberam componentes tóxicos, como ácidos graxos (saturados: palmítico e esteárico; insaturados: oléico e linoléico) e lisolecitinas, com efeitos deletérios sobre os espermatozoides. NUNES (1982) encontrou efeito deletério semelhante quando o diluidor era à base de leite desnatado. CHEMINEAU et al. (1991) recomendam que a gema de ovo seja evitada no meio de diluição a fim de evitar essa interação e efeito.

Para compensar as perdas com a congelação, deve-se aumentar o número de espermatozoides na dose inseminante para não reduzir a fertilidade e considerar a habilidade de fertilização da população sobrevivente (WATSON, 2000).

2.3 Testes in vitro para a avaliação da fertilidade

Na rotina de análise de sêmen para a predição da fertilidade, a concentração, motilidade e morfologias espermáticas, são avaliadas, na tentativa de se obter informações sobre o estado da espermatogênese e do potencial de fertilização do espermatozóide. Porém, estes testes são limitados e não podem avaliar a real habilidade de fertilização (CORREA et al., 1997).

Vários ensaios tem sido desenvolvidos para avaliar diferentes parâmetros funcionais do espermatozóide, como a quantidade de ATP, penetração no muco cervical, penetração no oócito, integridade da membrana e atividade da acrosina. Para a realização de testes, fatores como tempo dispendido, equipamentos, etc, limitam suas aplicações no campo (CORREA et al., 1997).

Além disso, outros problemas como variações quanto à repetibilidade do teste de qualidade do sêmen, relação entre as características quantitativas e qualitativas na dose inseminante, manipulação do sêmen e a sua possível injúria, viabilidade no trato genital feminino, fertilização e desenvolvimento embrionário estão também envolvidos (CORREA et al., 1997).

Ao se estudar a membrana espermática é importante observar se ela está intacta e funcional, sem implicações no seu metabolismo, capacitação, reação acrossomal, ligação e penetração no oócito. A elucidação destes mecanismos é de fundamental importância para resolver casos de infertilidade e escolha de condições ótimas para a performance de técnicas de reprodução assistida, como FIV, ICSI e outras. O estado da função da membrana plasmática parece ser um marcador específico da capacidade de fertilização do espermatozóide (CORREA et al., 1997).

Está claro que, somente a motilidade espermática não é adequada para explicar as diferenças entre a fertilidade dos machos. Em adição a este teste, o espermatozóide deve, também, ser capaz de sofrer a reação acrossomal se ligar e penetrar à zona pelúcida, ligar-se à membrana do oócito, ativá-lo e iniciar o desenvolvimento. A deficiência em alguma etapa reduz a fertilidade, faltando um consenso dos testes

laboratoriais para encontrar a verdadeira capacidade de fertilização do espermatozóide (MILLER et al., 1998).

Os testes de volume, motilidade, concentração e morfologia espermática tem valores limitados para a fertilização. Embora um método de acurácia para predizer a fertilidade no macho seja um grande objetivo a ser alcançado, as provas de capacitação, reação acrossomal e fertilização *in vitro* têm melhor correlação para a fertilidade (WHITHFIELD & PARKINSON, 1995).

A literatura mostra conflitantes considerações com relação às lesões de DNA e a fertilidade. São observadas correlações negativas entre as fragmentações do DNA e a qualidade do sêmen, e em homens inférteis, a proporção de espermatozoides com danos no DNA é significativamente alta (IRVINE et al., 2000).

É difícil considerar todos os fatores que influenciam em cada espécie na criopreservação e fertilidade do sêmen. Além disso, após a padronização na espécie, ainda existem diferenças entre as raças, indivíduos e entre cada ejaculado do mesmo indivíduo nos resultados de congelação e descongelação, levando ao contínuo problema de reconhecer os bons e os maus ejaculados para a congelabilidade (WATSON, 1995; HOLT, 2000).

Deve-se levar em consideração a complexa interação molecular natural entre o espermatozóide e o oócito, e o processo de capacitação e reação acrossomal. É necessário um diagnóstico das funções essenciais do espermatozóide, e nenhum teste de uma única função pode ser perfeitamente sensível para predizer a fertilidade com boa acurácia. O diagnóstico deve envolver os testes de capacitação, de reação acrossomal, penetração, e no futuro, categorias molécula-específica para ter uma boa interpretação dos resultados (MULLER, 2000).

2.4 Avaliação computadorizada da morfometria e motilidade espermática

A morfologia espermática normal é um bom indicador da fertilidade, entretanto, métodos para realização destas análises têm sido baseados numa avaliação subjetiva. Na avaliação da morfologia espermática humana, a variação entre técnicos e laboratoristas na porcentagem de espermatozóides normais é alta (BAKER & CLARKE, 1987). Este tipo de variação faz com que a acurácia na interpretação dos dados se torne extremamente difícil. Para reduzir a variação introduzida por métodos analíticos, o desenvolvimento de acurácia, objetividade e técnicas de repetibilidade são importantes.

Um método baseado na análise da morfometria de cabeça de espermatozóide, automatizado por computador (ASMA) foi desenvolvido (GRAVANCE et al., 1995). Este sistema de imagens demonstrou ser acurado, preciso e de repetibilidade. Além disso, é completamente automatizado, deste modo permite ser um método objetivo de análise.

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozóides é de grande importância devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilização dos espermatozóides. Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, penetração em ovócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro* (JANUSKUSKAS et al., 1999).

KOLIBIANAKIS et al. (1992) estudaram a relação entre a motilidade espermática analisada por computador e a forma convencional. Um total de 110 amostras seminais foram colhidas para avaliação dos parâmetros de movimentação dos espermatozóides. A análise da motilidade espermática pelo método automatizado foi altamente correlacionada com método convencional, sendo que a faixa de concentração espermática ótima das amostras para análise foi de até 50×10^6 células/mL. Concluíram que a análise computadorizada da motilidade pode ser uma alternativa rápida, objetiva e confiável para a avaliação rotineira de amostras de sêmen ou para pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

◆ Avaliar a influência de duas épocas distintas *in vivo* sobre a fertilidade e *in vitro* predizer a qualidade do sêmen de reprodutores caprinos das raças Boer e Alpina nas estações, reprodutiva (Outono) e não reprodutiva (Primavera)

3.2 Específicos

- ◆ Determinar a concentração de testosterona em machos das Raças Boer e Alpina nas estações, reprodutiva (outono) e não reprodutiva (primavera), relacionando-a com a fertilidade.
- ◆ Estudar características seminais clássicas dos reprodutores das raças Boer e Alpina em duas diferentes épocas do ano.
- ◆ Avaliar a qualidade e a fertilidade do sêmen pós-descongelamento nas estações, reprodutiva e não reprodutiva.
- ◆ Comparar os dados de fertilidade dos reprodutores das raças Boer e Alpina nas estações, reprodutiva e não reprodutiva com as seguintes provas *in vitro*: Integridade do DNA, Análises computadorizadas da Motilidade espermática, Morfometria da cabeça espermática, Atividade Mitoncondrial-Citoquímica e Integridade da membrana plasmática espermática .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Tratamentos

Após exame clínico geral e andrológico, foram selecionados nove reprodutores (com idade entre dois e cinco anos) das raças Boer (n=5) e Alpina (n=4), considerados normais e mantidos no Setor de Pequenos Ruminantes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia da FMVZ/Unesp, *Campus* de Botucatu.

O experimento foi conduzido nas estações, reprodutiva (outono) e não reprodutiva (primavera) – colheita e congelação do sêmen e testes para predição da fertilidade para a Etapa 1 e, inseminação artificial com sêmen congelado das duas estações para a Etapa 2.

Os machos foram mantidos em regime de criação intensiva, sob luminosidade natural, em uma latitude de 22°53'S e longitude 48°29'W, recebendo 0,9 KgMS/cabeça/dia de ração completa (concentrado + volumoso) e disponibilidade *ad libitum* de sal mineral e água.

As avaliações dos testes de predição de fertilidade com sêmen congelado colhido na etapa 1 foram realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de Jaboticabal, e a análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses – CASA) realizada na FMVZ/Unesp, *Campus* de Botucatu.

Na etapa 2, 164 fêmeas caprinas foram inseminadas após terem sido submetidas ao *flushing* alimentar e seguido pelo tratamento hormonal de sincronização e indução do estro, divididas em dois grupos. No grupo 1, 86 cabras foram inseminadas com sêmen congelado das raças Boer e Alpina colhido na estação reprodutiva (outono), e no grupo 2, inseminaram-se 78 fêmeas, com sêmen colhido na estação não reprodutiva (primavera). As fêmeas pertencentes a uma única propriedade localizada no estado do Maranhão foram mantidas em sistema extensivo de criação, sem alterar o manejo tradicional da região,.

Etapa 1

4.2 Colheita de sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método da vagina artificial com auxílio de uma fêmea caprina, ovariectomizada e estrogenada. As colheitas foram sempre procedidas pela manhã, durante os meses de abril-maio - outono (estação reprodutiva), e outubro - novembro – primavera (não reprodutiva).

4.3 Avaliação das características físicas do sêmen

Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram avaliados quanto aos parâmetros tradicionais, como seguem:

O volume, determinado pela leitura do tubo de colheita graduado em mililitros e mantido em banho-maria a 37°C.

O turbilhonamento (movimento massal), observado após a deposição de 10µL de sêmen sobre lâmina aquecida em placa aquecedora, sob microscopia óptica comum com aumento de 100 vezes e avaliado numa escala de zero a cinco.

Para se avaliar a motilidade (proporção de espermatozóides que apresentam motilidade) e o vigor espermático, uma alíquota de 20µL do ejaculado foi diluída em 3 mL de Solução Fisiológica a 0,9%. Desta diluição, uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C, seguindo-se à avaliação subjetiva da motilidade numa escala de 0-100%, e do vigor espermático, numa escala de 0-5 com aumento de 100 a 200 vezes sob microscopia óptica comum.

Como último procedimento, diluiu-se 0,01mL de sêmen em 3,9 mL de solução formol-salina (1:400), objetivando-se a contagem dos espermatozóides, com auxílio da Câmara de Neubauer, para se determinar a concentração.

4.4 Morfologia espermática

Para a análise morfológica, 20 μ L de sêmen recém-colhido foi diluído em 1mL de solução de glutaraldeído (0,2%) em frascos de vidro devidamente identificados e mantidos à temperatura de 4°C até o momento do uso. Alíquotas de 10 μ L foram colocadas sobre lâmina, cobertas com lamínula e avaliadas sob microscopia óptica de contraste de interferência diferencial de fase sob imersão. As alterações quanto à morfologia espermática foram classificadas de acordo com BLOM (1973).

4.5 Congelação do sêmen

Os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 37°C e diluídos em TRIS Modificado (RESENDE & WEITZE, 1987) numa proporção 1:1 até o ajuste da concentração final. Realizada a diluição final, os ejaculados foram levados para uma câmara de resfriamento a 4°C por duas horas e envasados em palhetas de 0,5 mL, devidamente identificadas e padronizadas numa concentração de 150 x 10⁶ espermatozóides móveis. Após o resfriamento e antes da congelação, uma ou duas amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade e vigor pós-resfriamento. Quando consideradas aptas, as palhetas contendo as doses de sêmen foram colocadas numa rampa de congelação a cinco centímetros dos vapores de Nitrogênio “líquido” por 15 minutos. Decorrido esse tempo, às palhetas foram imersas no Nitrogênio.

4.6 Descongelamento do sêmen

Para descongelamento das amostras de sêmen, as palhetas foram imersas em banho-maria à temperatura de 37°C durante 30 segundos, quando então foram submetidas aos testes para predição de fertilidade de acordo com os procedimentos experimentais propostos no item 4.7.

4.7 Testes para predição da fertilidade

4.7.1 Integridade do DNA: avaliação pelo método do acridine orange

Amostras de sêmen foram estudadas após a colheita e pós-congelamento na Etapa 1. Num período de até 30 minutos pós-colheita, uma amostra de sêmen (10µL) foi diluída com PBS (Phosphate Buffered Saline) e lavada duas vezes por centrifugação durante 5 minutos a 1300g. O “pellet” foi ressuspensão e uma contagem final foi ajustada para 50 milhões/mL. Um esfregaço de pequena alíquota do ejaculado foi confeccionado sobre lâminas limpas e secas a temperatura ambiente. Os esfregaços foram fixados em solução de Carnoy (metanol/AAG – 3:1) por pelo menos 2 horas, e, após remoção do fixador, secos ao ar. A leitura dos esfregaços seguiu o protocolo usado por TEJADA et al., 1984. Colocou-se sobre os esfregaços 2 mL de solução corante (10 mL de solução estoque de acridine orange 0,1%, 40 mL de ácido cítrico 0,1 M e 2,5 mL de fosfato dissódico 0,3 M) por cinco minutos, seguido de lavagem delicada das lâminas com água do Milli-Q. Após serem cobertas por lamínulas e remoção do excesso de água com auxílio de papel de filtro, os espermatozoides foram examinados com auxílio de microscópio dotado de iluminação epifluorescente (Fluorvet, Leitz, Germany) usando o filtro de excitação (490nm) e filtro de barreira (530nm) sob imersão (100x).

4.7.2 Avaliação dos parâmetros da motilidade espermática computadorizada (CASA)

Uma amostra de 10 μL sêmen pós-colheita foi colocada em tubo de *ependorf* de 1,5 mL e diluída com 600 μL de PBS, resultando em concentração de aproximadamente 50×10^6 espermatozoides/mL. A amostra diluída foi mantida a 37°C por cinco minutos antes da avaliação, após o que, uma alíquota de 10 μL foi colocada sobre lâmina pré-aquecida para a avaliação computadorizada da motilidade (ComputerAssisted Semen Analyses - CASA). As análises do sêmen foram realizadas por um aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTMA - IVOS, Hamilton Thorne Research, Danvers, MA, USA). Os parâmetros da motilidade espermática gerados pelo sistema foram: Motilidade (%); Motilidade Progressiva (%); Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$); Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$); Amplitude Lateral da Cabeça (ALH, μm); Frequência de Batimentos (BCF, Hz); Retilinearidade (STR, %); Linearidade (LIN, %) e Velocidade Rápida (%). O mesmo procedimento foi realizado com amostras do sêmen descongelado.

4.7.3 Morfometria da cabeça espermática

Para a realização das avaliações morfométricas da cabeça do espermatozoide, uma alíquota de sêmen (10 μL) diluído em PBS (item 4.7.1) foi colocada sobre lâmina e um esfregaço foi preparado (duas lâminas por ejaculado de cada animal e estação) para sêmen pós-colheita e pós-congelado. Os esfregaços foram corados com Hematoxilina, como descrito por GRAVANCE et al. (1995). Após corados, os esfregaços foram, com auxílio de Entellan (Merck - Germany), sobrepostos por lamínulas fixadas permanentemente sobre a lâmina. As cabeças dos espermatozoides foram mensuradas quanto ao comprimento (μm), largura (μm), área (μm^2) e perímetro (μm) utilizando-se microscópio de luz (Olympus) adaptado a um sistema

computadorizado de análise de imagens denominado Image Pro- Plus da Cybermetrica do Brasil.

4.7.4 Atividade Mitocondrial – atividade citoquímica.

A atividade citoquímica foi determinada usando o método descrito por HRUDKA (1987). Amostra de sêmen *in natura* e após descongelação foram incubadas em meio contendo Diaminobenzidine (DAB-Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dissolvido em fosfato de Sódio 0,15M, pH 7,2, a uma concentração de 1mg/mL e manuseado na ausência de luz.

Uma alíquota de 10 μ L (*in natura*) e 250 μ L (pós-descongelação) de sêmen foi adicionada a 1 mL e 750 μ L, respectivamente, do meio de incubação, homogeneizada em tubo de ensaio aberto, colocada em banho-maria a 37°C, durante 60 minutos, na ausência de luz. Para cada ensaio realizado, um controle negativo foi obtido da incubação de uma amostra de sêmen aquecida a 100°C por cinco minutos e adicionada ao meio de incubação nas mesmas proporções do teste.

Após incubação foram preparados dois esfregaços de cada suspensão, fixados em formaldeído 10% por 10 minutos, lavados e secos ao ar. As avaliações dos espermatozoides foram feitas em objetiva 100x, sob imersão em óleo, usando microscopia de contraste de fase (Nikon, modelo SKT, Japan). Foram classificados 200 espermatozoides (200 por duplicata) por ejaculado.

A avaliação da atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides obedece escala de quatro classes propostas por HRUDKA (1987), onde:

- Classe 1: Quase todas as mitocôndrias são ativas, ou seja, contêm um produto de reação colorida dando à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente.
- Classe 2: A bainha mitocondrial aparece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos.

- Classe 3: Espermatozoides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas.
- Classe 4: Espermatozoides completamente inativos.

Cada classe da escala foi multiplicada por um fator de correção, como segue: 1:1,0; 2:0,5; 3:0,25; 4:0,0. Desta forma calcula-se o índice de atividade citoquímica (IAC), multiplicando-se o número de espermatozoides encontrados em cada uma das classes pelo seu escore relativo.

Os testes foram feitos em duplicata de todos ejaculados (sêmen fresco e congelado) de cada reprodutor em cada época.

4.7.5 Integridade da membrana plasmática do espermatozoide com sondas fluorescentes

Para a análise da integridade da membrana plasmática do espermatozoide com sondas fluorescentes, 10 μL de sêmen foi diluído em 1 mL de solução salina estoque, recebendo após a homogeneização, uma adição de 40 μL da solução corante, sendo então incubado em banho-maria a 37 °C durante dez minutos. A solução à base de corantes biológicos fluorescentes estavam de acordo com o método descrito por HARRISON e VICKERS (1990). O meio de coloração foi preparado pela adição de 20 μL de solução estoque de formaldeído, 20 μL de Diacetato de Carboxifluoresceína e 10 μL de Iodeto de Propídio para cada mL de solução salina estoque. Alíquotas de 10 μL da suspensão corante foram depositadas em lâmina, cobertas com lamínulas e observadas sob microscopia óptica epifluorescente (Marca Leitz, Modelo Fluovert, Germany) com aumento de 1000 x. Para a visualização da suspensão corante, foram utilizados de modo alternado filtros de fluoresceína (luz azul) e rodamina (luz verde) para os corantes Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio, respectivamente. Foram contadas 200 células por lâmina de cada ejaculado, tendo-se por base a classificação proposta por HARRISON e VICKERS (1990):

- Categoria 1: acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e cauda, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha) = células espermáticas com membranas plasmáticas íntegras;
- Categoria 2: acúmulo de DIC na peça intermediária e acúmulo de IP na cabeça unicamente = células espermáticas com membranas plasmáticas e acrosomais danificadas e membranas mitocondriais intactas;
- Categoria 3: acúmulo de DIC na região acrosomal e peça intermediária e acúmulo de IP na cabeça = células espermáticas com membranas acrosomais e mitocondriais íntegras e membranas plasmáticas danificadas;
- Categoria 4: acúmulo de DIC ao longo da cabeça e acúmulo de IP na peça intermediária = células espermáticas com membranas acrosomais e plasmáticas íntegras e membranas mitocondriais danificadas;
- Categoria 5: acúmulo de IP ao longo da cabeça e cauda, sem acúmulo de DIC = células espermáticas com membranas plasmáticas, acrosomais e mitocondriais danificadas.

Foram avaliadas amostras de sêmen fresco e congelado das estações, reprodutiva (outono) e não reprodutiva (primavera).

4.8 Colheitas das amostras de sangue

Após antissepsia local com álcool, amostra de sangue de cada um dos reprodutores foram colhidas diariamente nas estações reprodutiva (outono) e não reprodutiva (primavera) sempre no mesmo horário (7h e 30min) por punção da veia jugular, em tubos Vacutainer[®] de cinco mL com anticoagulante. O sangue foi centrifugado e o plasma extraído dividido em duas alíquotas, as quais foram congeladas em *ependorf* e armazenadas à temperatura de -20°C . A testosterona foi mensurada pelo teste de radioimunoensaio (RIA) por um conjunto comercial de reagentes (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation- DPC, Los Angeles, CA).

Etapa 2

4.9 Sincronização do estro

As fêmeas foram submetidas ao *flushing* alimentar antes do tratamento de indução e sincronização do estro. O tratamento hormonal das cabras consistia na deposição de esponjas intravaginais impregnadas com 60µg de acetato de medroxiprogesterona (MAP - Progespon[®], Tecnopec, Brasil) por 11 dias. No nono dia do tratamento foram aplicados, por via intra-muscular, 50µg de d-cloprostenol (Prolise, Tecnopec, Brasil) e 200U.I. de Gonadotrofina Coriônica eqüina (eCG - Novorm[®], Syntex, Argentina). Após 12 horas da retirada da esponja com progestágeno, os animais foram submetidos a detecção do estro com auxílio de rufiões, a intervalos de 12 h durante 48 horas.

4.10 Inseminação artificial

Todas fêmeas foram inseminadas por via cervical profunda, 10-12h após início do estro, com sêmen congelado/descongelado dos reprodutores selecionados das raças Boer e Alpina colhidos na Etapa 1.

4.11 Análise estatística

Realizou-se uma análise de variância seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer para cada uma das variáveis estudadas. Quando estas não apresentaram uma distribuição normal, (requisito do teste F na análise de variância), obteve-se uma variável transformada com distribuição normal de acordo com a transformação de BOX e COX (1964).

$$y^t = Y^? - (1-Y)^?/?$$

onde Y^t a variável transformada, Y variável observada e o $?$ uma constante para a transformação.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijklm} = \mu + \gamma_i + b_{ij} + e_k + m_{kl} + \varepsilon_{ijklm}$$

onde: Y_{ijklm} é a variável da m -ésima amostra; γ_i é o efeito fixo da i -ésima raça ($i=1,2$); b_{ij} é o efeito do j -ésimo bode dentro da i -ésima raça ($i=1, j=1, \dots, 5$ e $i=2, j=1, \dots, 4$); e_k é o efeito fixo da k -ésima estação ($k=1,2$); m_{kl} é o efeito fixo do l -ésimo método dentro da k -ésima estação ($k=1, l=1,2$ e $k=2, l=1,2$); μ é a média geral.

Para a quantificação hormonal de testosterona foi realizado um teste T de Student para diferenças de médias, e, para a variável taxa de fertilidade (prenhez), realizou-se teste qui-quadrado para avaliar as diferenças entre raças e estações.

Toda as informações foram analisadas usando SAS System v.8.2 (SAS, 2003), usando-se os procedimentos GLM, FREQ e TTEST, e utilizou-se um nível de significância de 0,01 para todos os testes de hipóteses.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das características do sêmen

O reprodutor caprino apresenta-se com um potencial reprodutivo bastante expressivo, quando comparado a outras espécies, principalmente aos ruminantes. Essa potencialidade caracteriza-se pelos aspectos qualitativos da produção espermática (NUNES, 1982). Os caprinos europeus deixam de se reproduzir durante vários meses do ano, de março a julho, devido ao fotoperíodo. No macho, por observações precisas sobre o comportamento sexual, constata-se uma variação estacional muito acentuada, traduzida pelo número de saltos semanais, que pode estar influenciado pelas variações concomitantes da secreção de andrógenos. O problema da libido poderá em parte ser solucionado, pois os animais treinados a ejacular em vagina artificial o fazem desde que estejam bem condicionados ao ato. Mas as variações estacionais continuam presentes no ejaculado, e se traduzem pela diminuição do volume do sêmen e aumento da concentração em espermatozóides (CHEMINEAU et al., 1991)).

Muitos avanços tem sido feito para ajustar os efeitos da estação em reprodutores caprinos sob altas latitudes com o objetivo de colher satisfatoriamente ejaculados durante todo o ano (LEBOEUF et al., 2000).

As características seminais de caprinos das raças Boer e Alpina colhidos no Outono e Primavera encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e erros padrões (\pm) do volume (Vol), turbilhonamento (Tur), concentração espermática (Conc/mL), motilidade e vigor de ejaculados caprinos das raças Boer e Alpina colhidos no outono e primavera, Botucautu-SP, 2003.

	Outono		Primavera	
	Boer(n=37)	Alpina(n=37)	Boer(n=31)	Alpina (n=40)
Vol (mL)	0,97 \pm 0,05 ^a	0,80 \pm 0,04 ^{ab}	0,83 \pm 0,06 ^{ab}	0,67 \pm 0,05 ^b
Tur (0-5)	3,62 \pm 0,91 ^a	3,37 \pm 0,89 ^a	3,81 \pm 0,62 ^a	3,96 \pm 0,63 ^a
Conc (x10 ⁶)/mL	3040,93 \pm 274 ^{ab}	2513,11 \pm 235 ^b	4808,15 \pm 338 ^a	3571,98 \pm 248 ^{ab}
Motilidade (%)	78,56 \pm 7,78 ^a	77,44 \pm 12,39 ^a	82,5 \pm 10,80 ^a	78,37 \pm 11,33 ^a
Vigor (0-5)	3,95 \pm 0,11 ^a	4,14 \pm 0,11 ^a	3,81 \pm 0,15 ^a	3,83 \pm 0,11 ^a

Médias seguidas da mesma letra e linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P>0,01); n=número de observações para cada parâmetro

De acordo com os resultados, notou-se que para o parâmetro volume houve diferença estatística quando foram comparadas às raças entre estações. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre raças dentro da estação. Quando foram avaliadas estações diferentes, a raça Boer apresentou a média de volume significativamente maior que a raça Alpina.

As médias da concentração espermática observada entre raças dentro das estações não diferiu estatisticamente. Entretanto, houve diferença estatística para raça entre as estações.

Os parâmetros de motilidade, vigor e turbilhonamento não apresentaram diferenças estatísticas entre as raças e entre as estações nas condições do deste estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em caprinos da raça Boer criados a uma latitude de 25-35°S também não apresentando variações na motilidade espermática (GREYLING & GROBBELAR, 1983).

A variável raça, dentro da mesma estação, primavera e outono, não afetou quantitativamente (volume e concentração) e nem qualitativamente (turbilhonamento, percentagem de espermatozóides móveis e vigor) o sêmen.

É bem conhecido que o ejaculado do macho caprino, assim como o do carneiro apresenta um baixo volume (0,7 a 2,0mL), com alta concentração, uma alta porcentagem de espermatozóides móveis (70 – 90%) e baixa porcentagem de espermatozóides anormais (limite 5-10%) (CHEMINEAU et al.,1991). Para CBRA (1998), o caprino apresenta uma média nas variáveis, volume de 0,8mL, vigor de 3, número total de espermatozóides de dois bilhões, motilidade espermática de 80% e 90% de espermatozóides normais.

Para NUNES & FERNÁNDEZ (2001) o volume do sêmen caprino pode variar de 0,5 a 2,0mL com uma concentração normal de 3 bilhões/mL de espermatozóides. As diferenças entre raças sempre estão presentes. Os bodes alpinos apresentam um volume de sêmen significativamente mais elevado ($P < 0,01$) que aquele das raças Poitvine e Saanen (NUNES, 1982). PÉREZ & MATEOS (1996) não encontraram diferenças para o volume e a concentração no outono e na primavera para a raça Malagueña criados em Madrid (40°N).

KARAGIANNIDIS et al. (2000) observaram que a raça Alpina produziu um maior volume seminal, mas, com menor qualidade do que os reprodutores Saanen e Damascus. Entretanto, um maior volume foi encontrado no outono e no verão para as três raças, em relação à primavera, assim como observado neste estudo para os volumes dos ejaculados dos reprodutores das raças Boer e Alpina colhido no outono em relação ao da primavera.

Em rebanhos das raças Alpina e Poitevine o volume do ejaculado é maior no outono e inverno, durante a estação sexual e diminui para um mínimo na primavera e verão, a estação não sexual (LEBOEUF et al., 2000). A concentração espermática do ejaculado segue uma direção oposta (CORTEEL, 1974) refletindo variação sazonal na secreção e liberação do plasma seminal das glândulas acessórias, nas quais são ativas quando a concentração de testosterona está alta na estação sexual e quiescente quando testosterona está baixa durante a estação não sexual (LEBOEUF et al., 2000).

A concentração seminal pode variar de 1 a $3,5 \times 10^9$ espermatozóides por mL, segundo as raças, zonas geográficas e a estação do ano (NUNES, 1982). A estimativa na produção espermática diária por testículo, varia de 2,76 a $7,23 \times 10^9$ espermatozóide

por testículo, com sensível variação sazonal de rebanho (LEBOEUF et al., 2000). Foi possível verificar uma sensível alteração na concentração espermática entre as raças Alpina no outono, e Boer na primavera.

TULI & HOLTZ (1995) avaliando a porcentagem de espermatozoides móveis e vivos pré-resfriado e pós-descongelção de caprinos da raça Boer em zona temperada, concluíram que na localização geográfica da Alemanha onde o estudo foi conduzido, a sazonalidade é um fator que interfere no sucesso da congelação do sêmen de caprinos da raça Boer.

Resultados observados por KARAGIANNIDIS et al. (2000) avaliando variações nas características seminais durante as estações do ano de caprinos das raças Alpina, Saanen e Damascus nascidos e criados na Grécia (40°37'N, 22°58'E e altitude 32m acima do nível do mar. Observaram uma diferença significativa entre as raças e entre os indivíduos dentro de cada raça em todas as características estudadas. Esses autores concluíram que o melhor sêmen foi o produzido no final do verão e no outono. Entretanto, a magnitude dos efeitos das estações do ano não foram suficientes para evitar que esses reprodutores fossem usados no acasalamento ao longo do ano. Contudo, para detectar as diferenças individuais nas características quanti-qualitativas do sêmen entre reprodutores dentro da raça, faz-se necessário uma avaliação individual a fim de selecionar os machos mais férteis para o acasalamento.

Baseado nas condições deste estudo foi observado que diferenças na produção do sêmen foram encontradas em ambas raças e estações. Entretanto, as diferenças nos parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen não foram muito marcantes. Cabe ressaltar que, apesar dos animais utilizados no presente experimento serem de raças *exóticas*, foram nascidos e criados em uma região com pouca alteração da luminosidade, podendo, portanto, terem sofrido um processo de adaptação.

Vários fatores podem modificar as características do sêmen de caprinos, incluindo alta temperatura ambiental conduzindo ao estresse térmico, a idade, a frequência de colheitas e a disponibilidade de alimentos. Em áreas tropicais, sêmen de carneiros obtido durante a estação chuvosa foi de melhor qualidade que o sêmen colhido durante a estação seca, na qual sugere que a sazonalidade reprodutiva é

influenciada pela nutrição em áreas onde a alteração da luz do dia é mínima (CARMENATE & GAMCIK, 1982).

A ação do fotoperíodo é, segundo MIES FILHO (1989), tanto mais intensa quanto maior a latitude. No local do presente estudo, Botucatu – SP, a latitude atinge 22°53'S e 46°29'W, esta influência ambiental é diminuída, pois atividade reprodutiva e nascimento ocorrem por todo o ano, com condições favoráveis.

Com estes resultados observou-se que, nas condições de latitude e luminosidade diárias existentes em Botucatu-SP, os caprinos das raças Boer e Alpina apresentaram sêmen de boa qualidade ao longo do ano (Tabela 1), permitindo a congelação com resultados satisfatórios na fertilização *in vivo* (Tabela 12), de forma semelhante aos resultados obtidos por SOUZA (1999) com carneiros das raça Ideal, também em Botucatu-SP, que apresentaram sêmen de boa qualidade durante todo o ano, possibilitando sua congelação, e bons resultados pelas análises *in vitro* após a descongelação, não apresentando estacionalidade reprodutiva. Vale ressaltar que os animais utilizados no presente experimento, são reprodutores que possuem certificado de registro genealógico junto a Associação Brasileira de Criadores de Caprinos (ABCC) o que os classifica como animais geneticamente superiores, podendo também este fato influenciar nos resultados encontrados.

5.2 Morfologia espermática

A relação entre a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais e fertilidade tem sido amplamente estudada no homem e nos animais domésticos.

A morfologia espermática do sêmen das raças Boer e Alpina, colhido no outono e na primavera, foi classificada em defeitos maiores e menores de acordo com BLOM (1973) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios e desvios padrões (\pm) da morfologia espermática (defeitos maiores, menores e total - %) de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e na primavera, Botucatu-SP, 2002.

Defeito	Outono		Primavera	
	Boer(n=8000)	Alpina(n=6400)	Boer(n=4800)	Alpina(n=6400)
Maior	1,11 \pm 0,09	0,33 \pm 0,02	0,57 \pm 0,39	0,64 \pm 0,32
Menor	3,65 \pm 0,24	4,35 \pm 0,41	1,62 \pm 0,02	1,87 \pm 0,08
Total	4,76\pm0,36	4,68\pm0,57	2,19\pm0,4	2,51\pm0,29

n= número de células

Os resultados da análise da morfologia espermática apresentaram-se dentro dos padrões da normalidade, considerando-se o limite de 15% (NUNES & FERNÁNDEZ, 2001). Isto indica que o momento da colheita, ou melhor, a estação do ano provavelmente não influenciou na porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais.

A porcentagem de espermatozóides anormais foi baixa durante o outono e na primavera, para as duas raças.

Detectou-se 4,25%, 4,68%, 2,19% e 2,51% de espermatozóides anormais após exame de 135 ejaculados provenientes de bodes das raças Boer e Alpina, no outono e na primavera, respectivamente. Os tipos de anormalidades não foram variáveis, os defeitos menores mais observados nas duas estações foram cauda simplesmente enrolada. Com relação aos defeitos maiores, a peça intermediária dobrada (tipo Dag), no outono, e a gota citoplasmática proximal, na primavera, foram os mais freqüentes.

Pesquisadores reportaram um aumento no número de anormalidades espermáticas em caprinos associado a enfermidades (ANOSA & ISOUN, 1980), ao estresse térmico (CORTEEL, 1974), e à sazonalidade (ROCA et al. 1992). LEBOEUF et al. (2000) relatam que pequena variação sazonal de 5 a 8% de espermatozóides com anormalidades tem sido observada, durante a estação de acasalamento, e de 10 a 18% em outras épocas.

Pode-se afirmar que o sêmen colhido no outono e na primavera em caprinos das raças Boer e Alpina criados em Botucatu-SP possui características dentro do padrão da espécie.

5.3 Testes para predição da fertilidade

5.3.1. Integridade do DNA: avaliação pelo “método acridine orange”

A resistência do espermatozóide à desintegração do DNA é um parâmetro importante na fertilidade (TEJADA et al., 1984). As causas dos danos ao DNA podem ser naturais, ou seja, durante a espermatogênese, ou provocadas durante a manipulação do ejaculado com agentes químicos ou físicos, nos processos de diluição, criopreservação e descongelação. Sendo que o mais importante é o processo de criopreservação que pode induzir a danos celulares irreversíveis, incluindo anormalidades na estrutura da cromatina e na integridade do DNA, o que resulta em dano celular e conseqüentemente diminuição do potencial fértil do espermatozóide (EVENSON et al., 1980). As conseqüências dos danos no DNA espermático durante o fenômeno de fertilização e posterior desenvolvimento embrionário, não são bem conhecidas e os possíveis prejuízos não são claros.

A condensação da cromatina espermática foi avaliada com uso de coloração AO. Isto se baseia em propriedades metacromáticas deste corante fluorescente, que emite cor verde (normais) para a dupla fita de DNA, e vermelho (danificado) para fita simples, demonstrando descondensação da cromatina. Porcentagens de espermatozoides com cromatina desnaturada foram mínimas e apresentaram baixas diferenças entre raças e estação (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências de espermatozoides (sptz) normais (cor verde) e danificados (cor alaranjada) (método acridine orange) nas amostras pós-colheita (PC) e pós-descongelamento (PD) de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e na primavera, Botucatu-SP, 2003.

Sptz	Outono		Primavera	
	Verdes %	Alaranjados %	Verdes %	Alaranjados %
Amostra/raça				
PC				
Boer	97,7	2,26	99,30	0,7
Alpina	94,91	5,03	99,36	0,64
PD				
Boer	95,38	4,61	96,38	3,61
Alpina	95,25	4,75	99,16	0,83

A Tabela 3 mostra a frequência de espermatozoides normais (corados de verdes - Figura 1) e danificados (alaranjados - Figura 2). Os resultados da avaliação da integridade da cromatina mostraram que todas as amostras pós-colheita e pós-descongelamento apresentaram espermatozoides com cromatina danificada nos percentuais que variaram de 0,64 a 5,03% (pós-colheita) e de 0,83 a 4,75% (pós-descongelamento), para raças Boer e Alpina, no outono e primavera, respectivamente. Como pode ser visto, ocorreram diferenças numéricas entre raças e entre estações quanto à coloração da cromatina dos espermatozoides. Devido ao fato da frequência ser inferior a 10% de alaranjados, e a proporção de 0,1 (10%) representa um sêmen normal, ou seja, com espermatozoides com alteração na estrutura do DNA que não comprometem a qualidade. Uma proporção de 0,9 (90%) seria para um sêmen de pior qualidade conforme descrito por EVENSON et al. (1980), optou-se por não serem analisados sob o ponto de vista estatístico.

Estas proporções foram descritas para o sêmen humano, assim como a proporção superior a 0,45 (45%) de células verdes é considerada apropriada para um alto índice de fertilização (SOFIKITIS et al., 1993). Em relação à espécie bovina, uma proporção de 0,19 a 0,40 (19 - 40%) poderia se considerar aceitável dependendo do

uso do sêmen, isto é, para inseminação artificial, fertilização *in vitro* ou injeção intracitoplasmática (BALLACHEY et al., 1988).

MARTINS et al. (2000) encontraram resultados inferiores a 10% quando avaliaram a integridade da cromatina do sêmen de touros das raças Curraleira e Pantaneira de programas de conservação da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, usando o mesmo método, o acridine orange descrito por TEJADA et al., (1984). Acrescentam que as alterações de cromatina dos espermatozóides podem comprometer a capacidade de fecundação de ovócitos maduros, bem como o desenvolvimento embrionário, reprodutores com taxas = 1,5% de DNA danificado podem apresentar fertilidade reduzida, demonstrando que a fertilidade do reprodutor não pode ser julgada apenas por análises padrões do sêmen e sugeriram que os outros testes são necessários para sua avaliação, principalmente quando o ejaculado apresenta boa motilidade e características morfológicas normais.

EVENSON et al. (1980) confirmaram que os mesmos resultados obtidos por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência em espermatozóides de touros subfêrteis corados com acridine orange.

Estudos realizados por BLOTTNER et al. (2001) encontraram uma diferença mínima na estabilidade da cromatina entre garanhões e menor efeito da estação ou criopreservação, verificando a alta estabilidade do DNA na extrema condensação do núcleo espermático. A descondensação da cromatina por agentes redutores de tiol não foi alterada após criopreservação (RODRIGUES & BUSTOS-OBREGON, 1996).

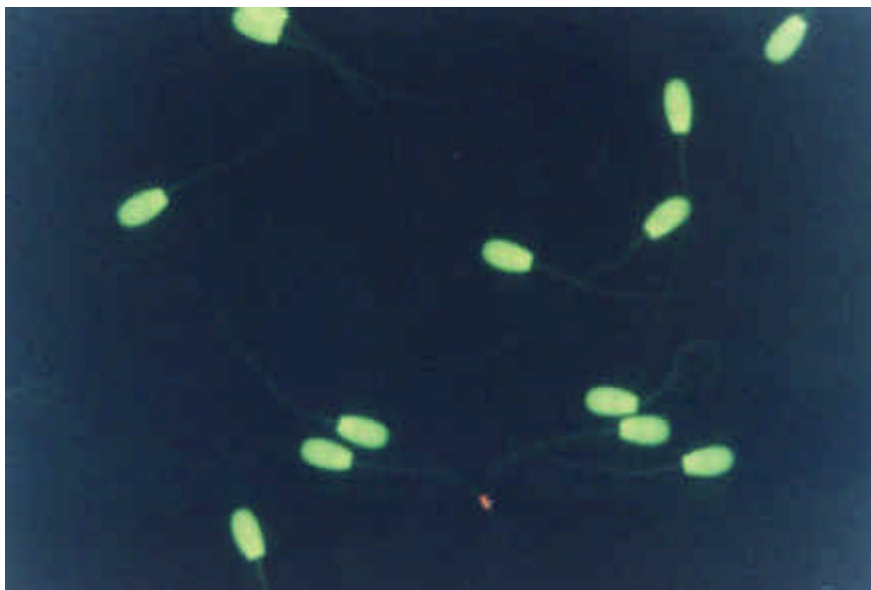


Figura 1. Coloração pela técnica "Acridine Orange" mostrando espermatozoides normais, sem DNA danificado (fluorescência verde). Aumento de 1000x.

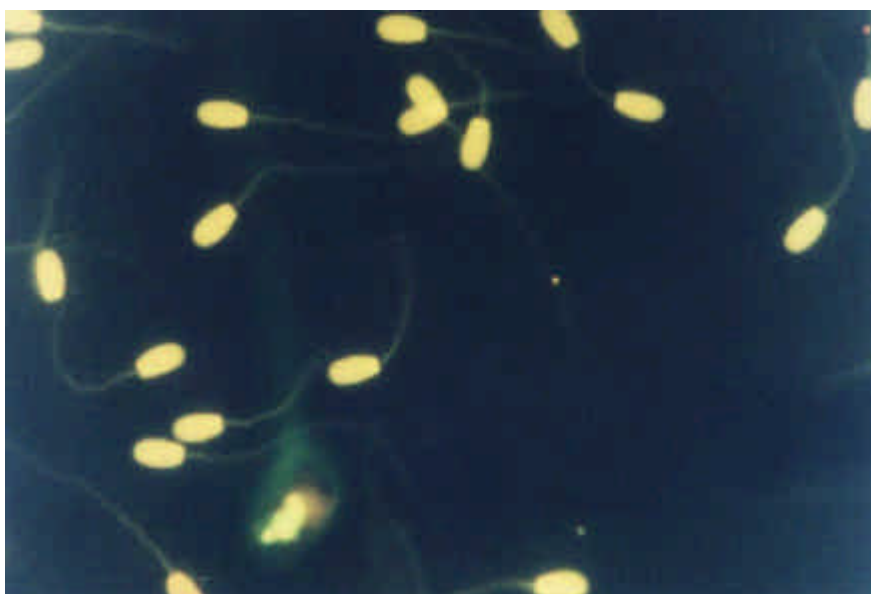


Figura 2. Coloração pela técnica "Acridine Orange" mostrando espermatozoides anormais, com DNA danificado (cor alaranjada). Aumento 1000x.

5.3.2 Avaliação dos parâmetros da motilidade espermática computadorizada (CASA)

A avaliação da motilidade e da morfologia da célula espermática são parâmetros essenciais no exame da qualidade do sêmen e no estabelecimento da correlação entre a qualidade do sêmen e a fertilidade (VERSTEGEN et al., 2002). Vários pesquisadores têm intensamente procurado desenvolver uma técnica laboratorial para predizer acuradamente a fertilidade do sêmen congelado (ARRUDA, 2000). Muitos fatores podem afetar a qualidade dos movimentos das células espermáticas. Estes incluem a temperatura da câmara de makler, processamento do sêmen, processo de congelação e descongelação, concentração espermática e processos patológicos do doador.

Nas Tabelas 4 e 5 Figuras de 3 a 16 são apresentados os parâmetros da motilidade espermática computadorizada (CASA) do sêmen caprino nas amostras pós-colheita e pós-descongelação das raças Boer e Alpina em duas estações, outono e primavera.

Tabela 4: Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para os parâmetros da motilidade dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita e pós-descongelamento, utilizando-se análises computadorizadas (Computer Assisted Semen Analyses, CASA), Botucatu-SP, 2002.

Parâmetros	Pós-colheita		Pós-descongelamento	
	Boer (n=69)	Alpina (n=76)	Boer (n=41)	Alpina (n=41)
Motilidade, %	93,15 \pm 1,83 ^a	90,72 \pm 2,86 ^a	51,05 \pm 3,31 ^b	53,00 \pm 4,32 ^b
Motilidade Progressiva, %	64,32 \pm 2,26 ^a	62,38 \pm 4,73 ^a	21,45 \pm 3,41 ^b	22,31 \pm 3,15 ^b
Velocidade de Trajeto (VAP), mm/seg	128,48 \pm 4,22 ^a	125,55 \pm 6,45 ^a	89,82 \pm 7,49 ^b	86,04 \pm 4,06 ^b
Velocidade Progressiva (VSL), mm/seg	107,32 \pm 4,03 ^a	104,77 \pm 6,00 ^a	71,78 \pm 4,05 ^b	69,85 \pm 3,26 ^b
Velocidade Curvilínea (VCL), mm/seg	205,47 \pm 7,03 ^a	209,14 \pm 9,07 ^a	148,54 \pm 10,66 ^b	144,21 \pm 6,22 ^b
Amplitude Lateral da cabeça (ALH), mm	6,09 \pm 1,30 ^a	6,37 \pm 1,80 ^a	6,25 \pm 0,81 ^a	5,81 \pm 0,97 ^a
Frequência de Batimentos (BCF), Hz	37,88 \pm 1,30 ^a	36,97 \pm 1,86 ^a	31,79 \pm 1,89 ^b	30,89 \pm 0,96 ^b
Retilinearidade (STR), %	82,91 \pm 1,58 ^a	82,10 \pm 2,43 ^a	79,96 \pm 3,52 ^a	81,03 \pm 2,50 ^a
Linearidade (LIN), %	53,47 \pm 2,56 ^a	53,34 \pm 3,39 ^a	48,41 \pm 4,08 ^a	50,76 \pm 2,86 ^a
Velocidade Rápida, %	90,06 \pm 2,14 ^a	87,85 \pm 3,41 ^a	35,73 \pm 3,91 ^b	33,77 \pm 3,76 ^b

Médias seguidas da mesma letra e linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,01$); n=número de observações para cada parâmetro

Tabela 5: Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para os parâmetros da motilidade dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono e na primavera, utilizando-se análises computadorizadas (Computer Assisted Semen Analyses, CASA), Botucatu-SP, 2002.

Parâmetros	Outono		Primavera	
	Boer (n=61)	Alpina (n=64)	Boer (n=47)	Alpina (n=54)
Motilidade, %	83,26 \pm 2,62 ^a	78,98 \pm 11,03 ^a	87,19 \pm 2,27 ^a	81,83 \pm 13,35 ^a
Motilidade Progressiva, %	44,67 \pm 13,63 ^a	40,72 \pm 11,19 ^a	46,26 \pm 14,70 ^a	43,75 \pm 15,86 ^a
Velocidade de Trajeto (VAP), mm/seg	115,26 \pm 7,21 ^a	117,32 \pm 9,05 ^a	95,71 \pm 14,87 ^a	102,72 \pm 13,65 ^a
Velocidade Progressiva (VSL), mm/seg	91,02 \pm 7,94 ^a	92,21 \pm 9,09 ^a	80,60 \pm 12,72 ^a	81,80 \pm 12,78 ^a
Velocidade Curvilínea (VCL), mm/seg	196,14 \pm 8,39 ^a	204,38 \pm 10,70 ^a	165,44 \pm 20,19 ^a	170,06 \pm 16,09 ^a
Amplitude Lateral da cabeça (ALH), mm	6,41 \pm 1,00 ^a	6,65 \pm 0,91 ^a	5,73 \pm 0,75 ^a	5,76 \pm 1,53 ^a
Frequência de Batimentos (BCF), Hz	35,79 \pm 2,92 ^a	34,91 \pm 2,67 ^a	33,88 \pm 3,24 ^a	34,23 \pm 3,61 ^a
Retilinearidade (STR), %	80,49 \pm 3,12 ^a	80,21 \pm 2,22 ^a	83,07 \pm 1,94 ^a	82,85 \pm 2,09 ^a
Linearidade (LIN), %	48,73 \pm 3,79 ^a	49,52 \pm 3,35 ^a	54,05 \pm 2,33 ^a	54,34 \pm 1,82 ^a
Velocidade Rápida, %	73,72 \pm 14,67 ^a	73,02 \pm 12,54 ^a	75,29 \pm 18,54 ^a	69,28 \pm 19,38 ^a

Médias seguidas da mesma letra e linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,01$). n=número de observações para cada parâmetro

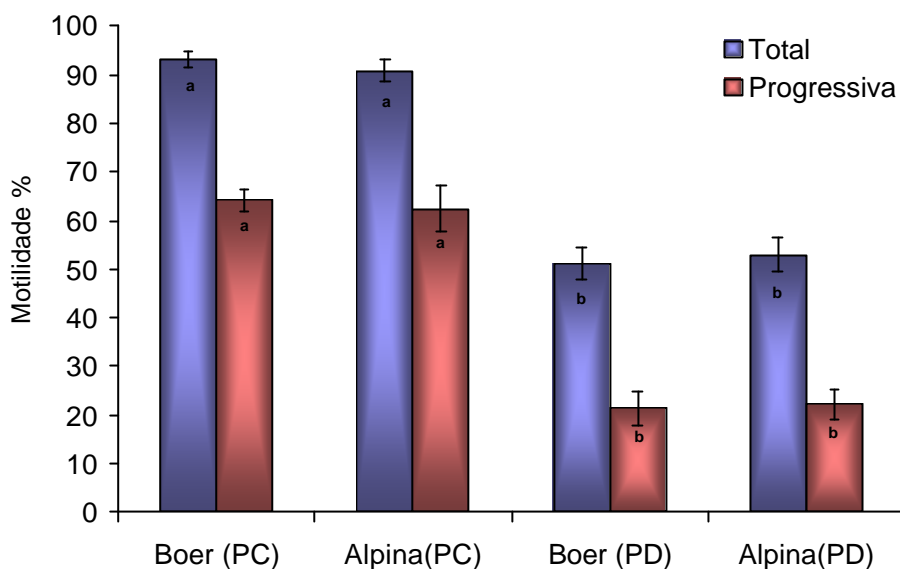


Figura. 3. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos para motilidade total e progressiva dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P < 0,01$)

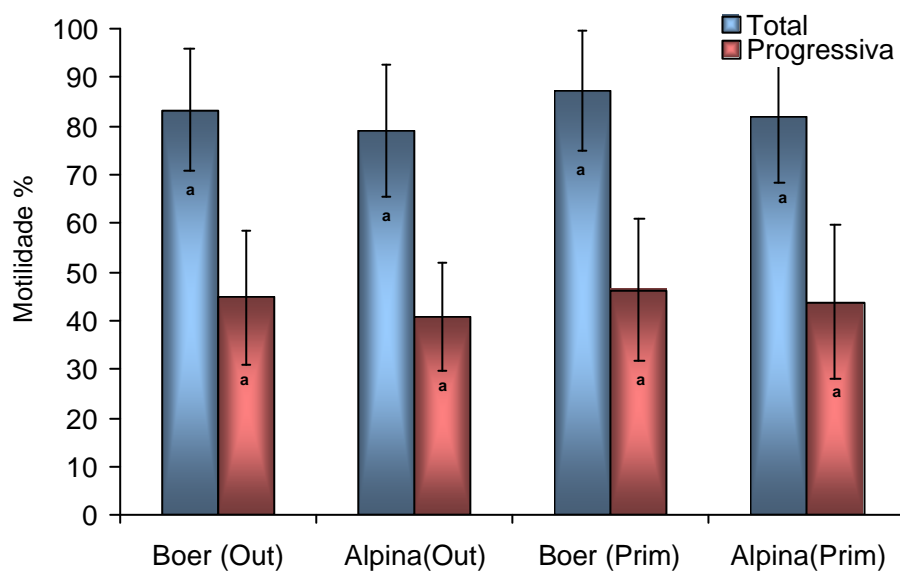


Figura 4 Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos para motilidade total e progressiva dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses - CASA) ($P > 0,01$).

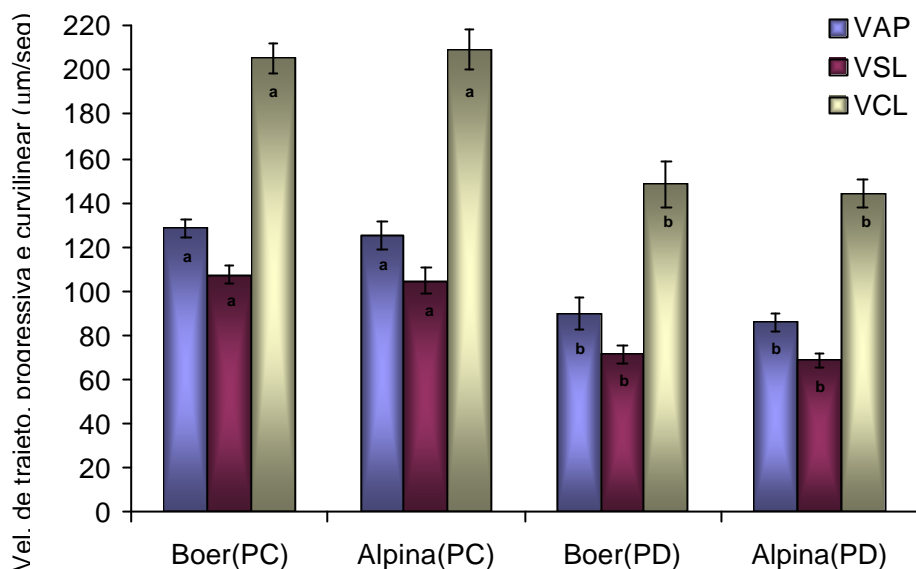


Figura 5. Médias e desvios padrões ajustados (µm/seg) por quadrados mínimos para velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA)(P<0,01).

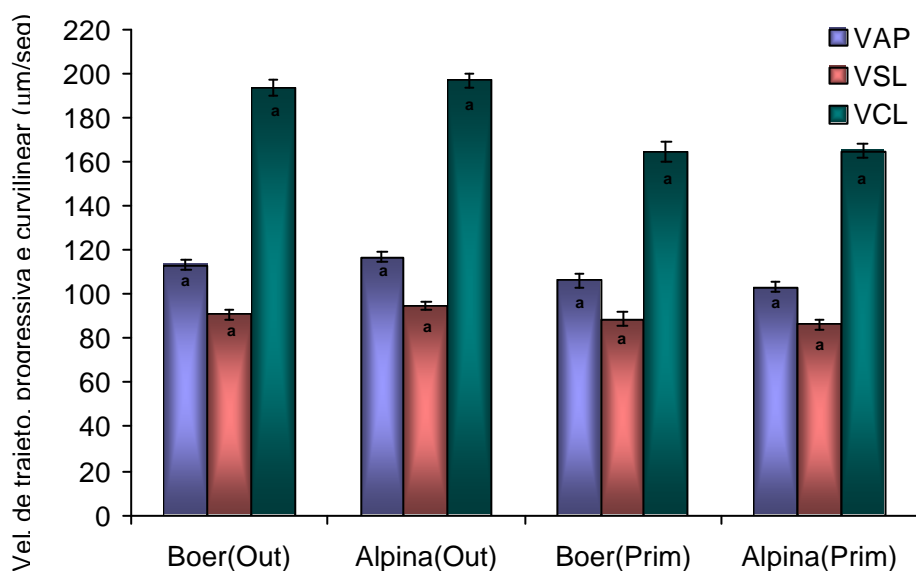


Figura 6. Médias e desvios padrões ajustados (µm/seg) por quadrados mínimos para velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, outono (Out) e primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA)(P>0,01).

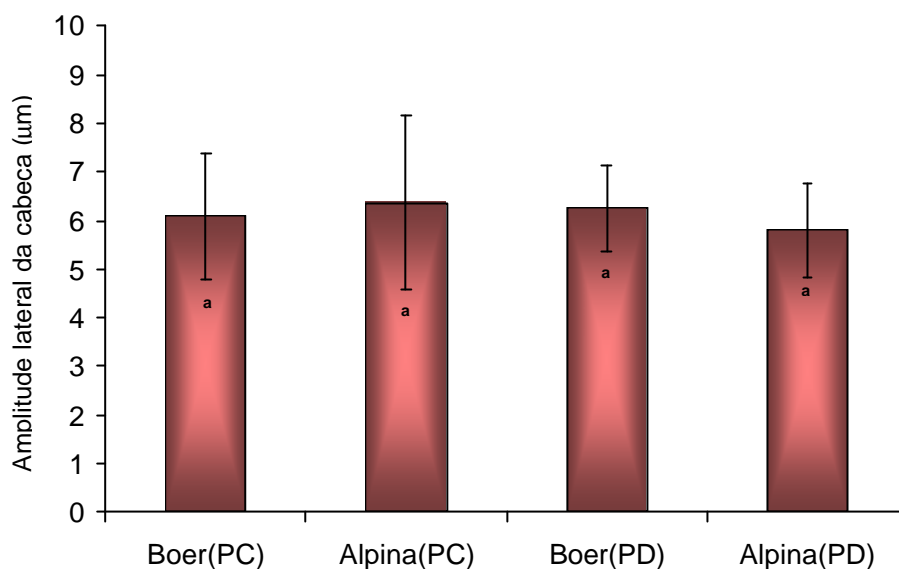


Figura 7. Médias e desvios padrões ajustados (μm) por quadrados mínimos da amplitude lateral da cabeça (ALH) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P > 0,01$).

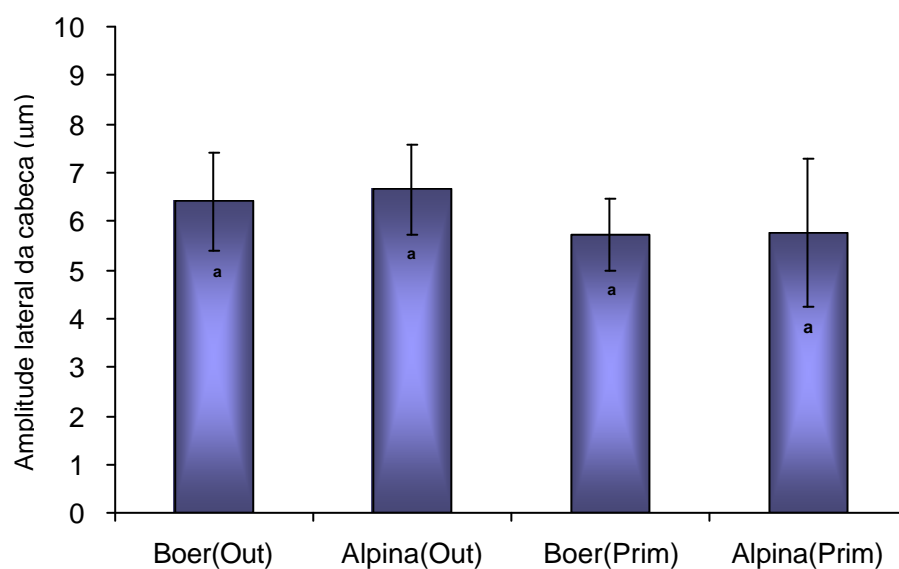


Figura 8. Médias e desvios padrões ajustados (μm) por quadrados mínimos da amplitude lateral da cabeça (ALH) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P > 0,01$).

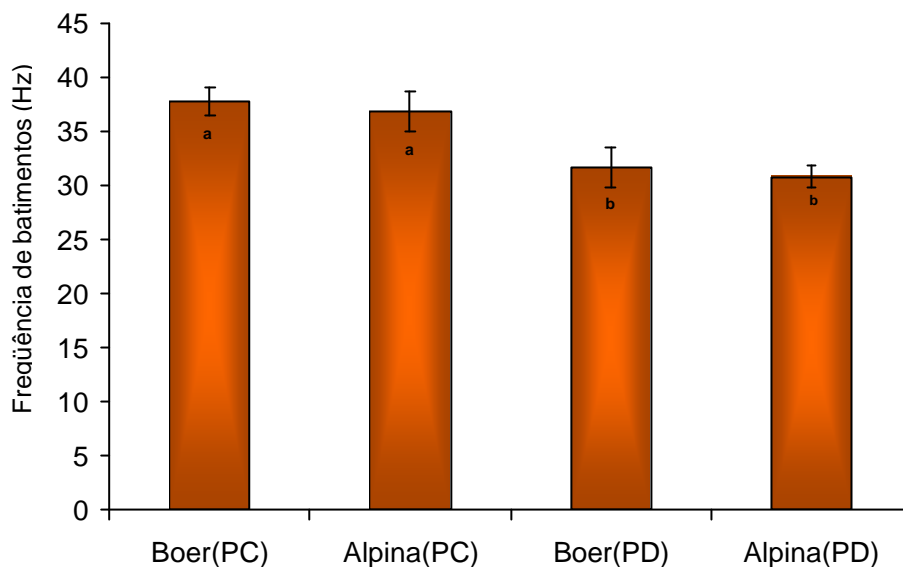


Figura 9. Médias e desvios padrões ajustados (Hz) por quadrados mínimos da frequência de batimentos (BCF) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelamento (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA)($P < 0,01$).

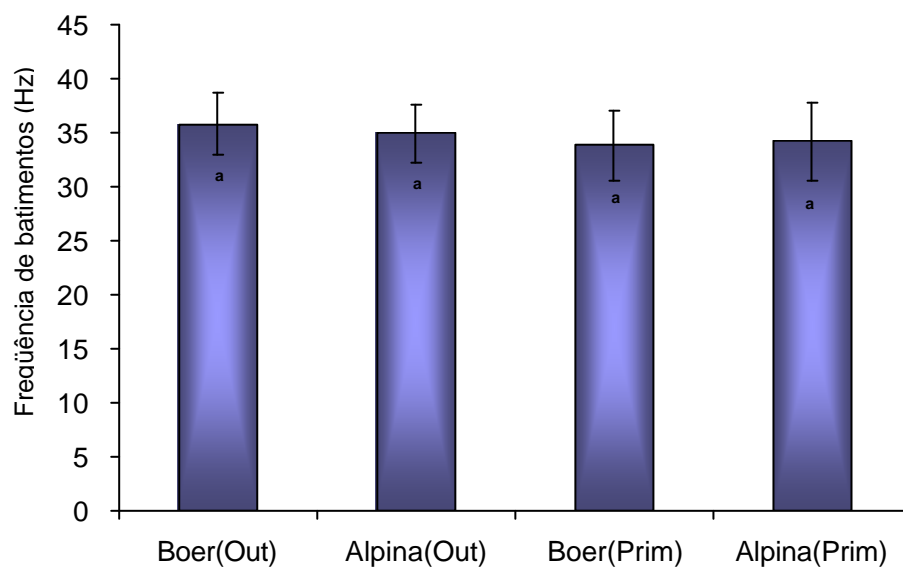


Figura 10. Médias e desvios padrões ajustados (Hz) por quadrados mínimos da frequência de batimentos (BCF) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA)($P > 0,01$).

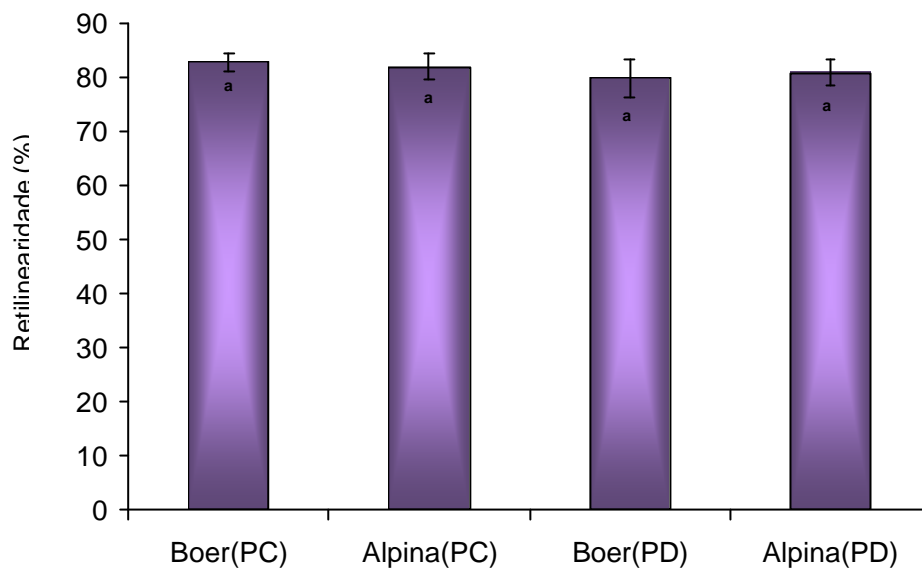


Figura 11. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da retilinearidade (STR) dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA)($P>0,01$).

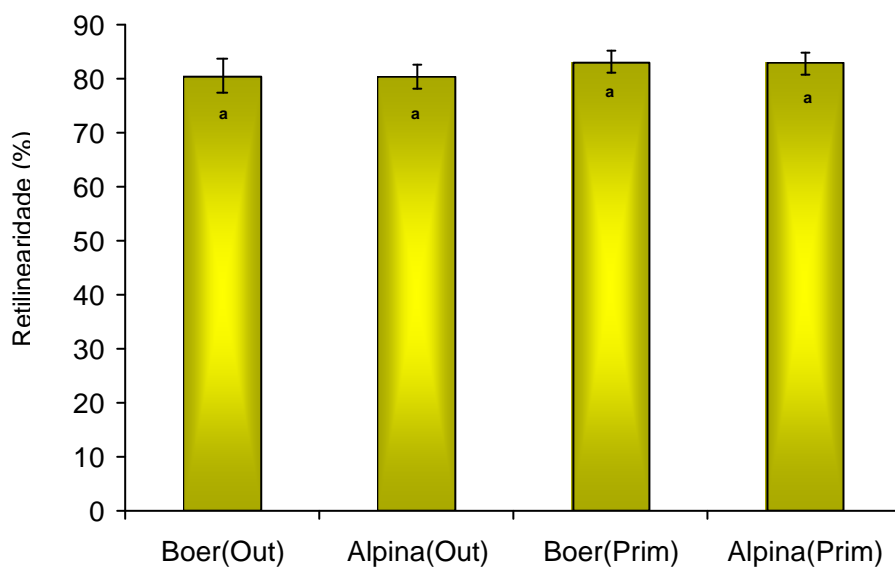


Figura 12. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da retilinearidade (STR) dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA)($P>0,01$).

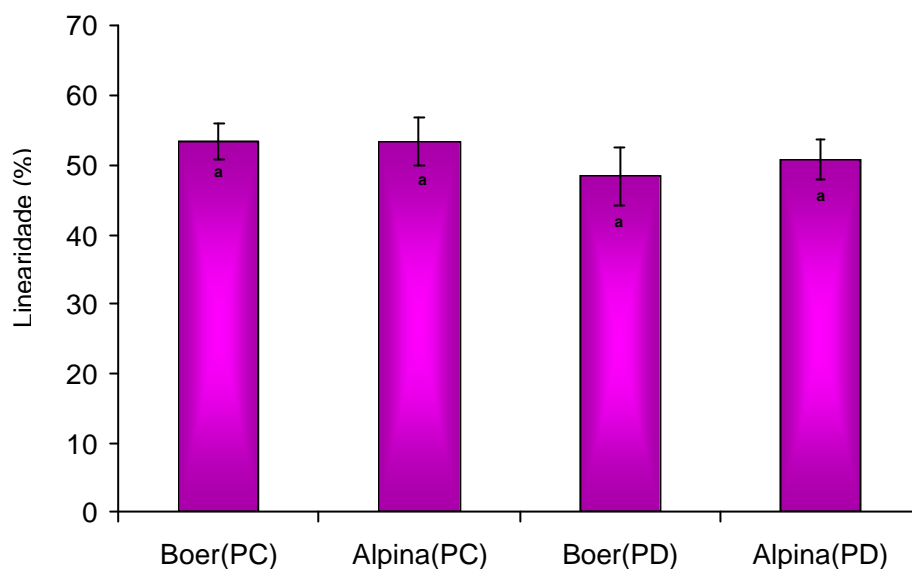


Figura 13. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da linearidade (LIN) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelamento (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P > 0,01$).

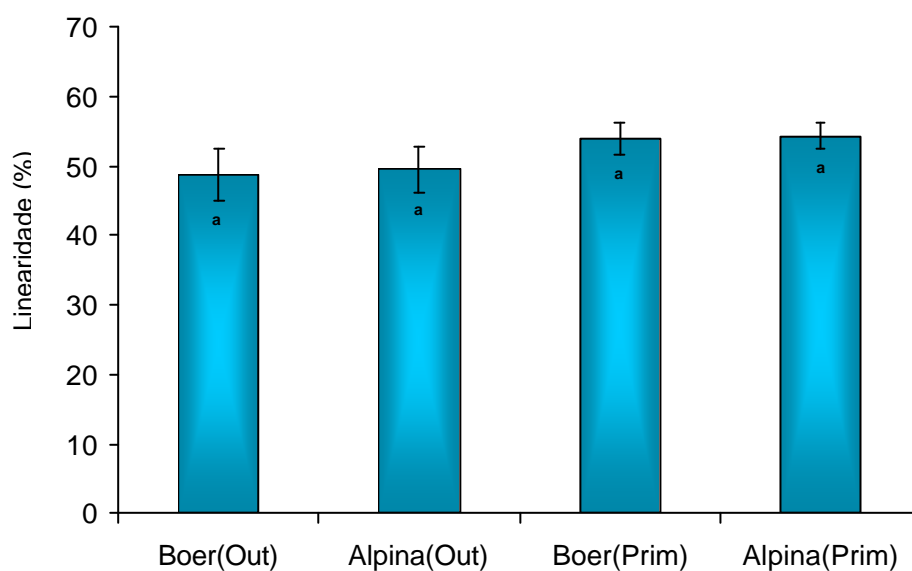


Figura 14. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da linearidade (LIN) dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) ($P > 0,01$).

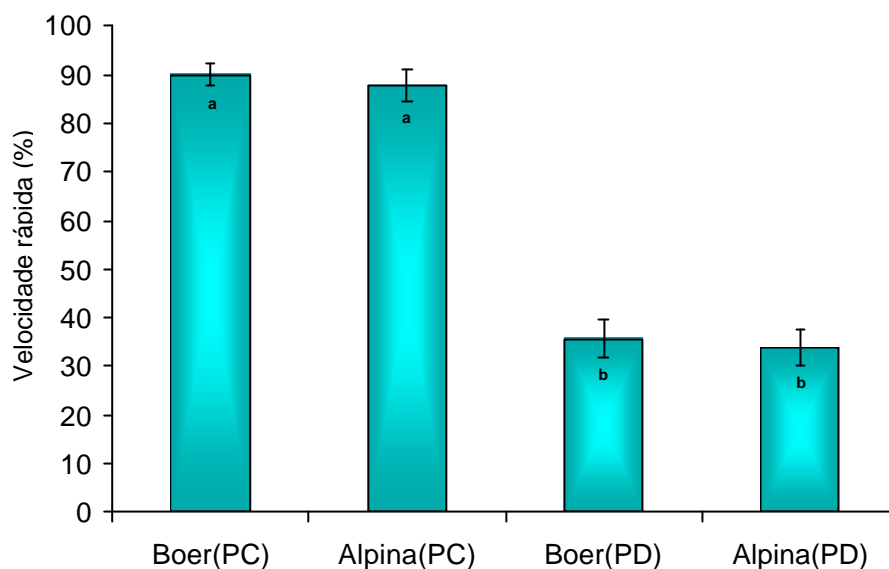


Figura 15. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da velocidade rápida dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, pós-colheita (PC) e pós-descongelção (PD), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, CASA)($P < 0,01$).

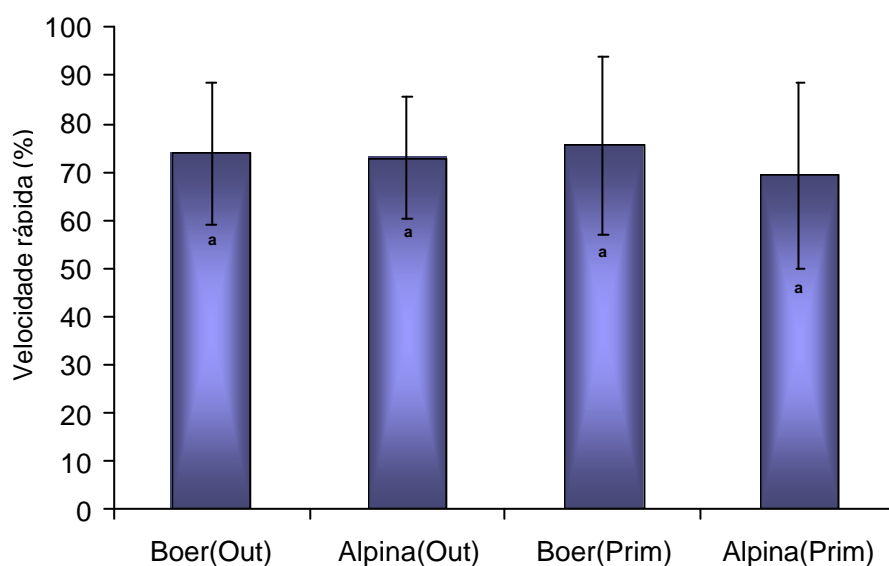


Figura 16. Médias e desvios padrões ajustados (%) por quadrados mínimos da velocidade rápida dos espermatozóides caprinos das raças Boer e Alpina, no outono (Out) e na primavera (Prim), utilizando-se análise computadorizada (Computer Assisted Semen Analyses, (CASA) ($P > 0,01$).

Os valores da motilidade espermática analisados pelo sistema computadorizado (CASA) apresentaram diferença significativa entre as amostras, pós-colheita e pós-descongelamento nas raças Boer e Alpina, para os parâmetros motilidade, MP, VAP, VSL, VCL, BCF e velocidade rápida. No entanto, para ALH, STR e LIN não houve diferença entre as amostras. O mesmo ocorreu entre as raças nas mesmas amostras, onde não se observou diferenças estatísticas. Já era esperado que as estimativas para o sêmen descongelado fossem alteradas em relação ao sêmen fresco, já que o processo de congelamento/descongelamento interfere nos movimentos espermáticos.

Quando se observa os parâmetros da motilidade pelo sistema CASA entre o outono e a primavera, e entre as raças, todos parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas, indicando que a época da colheita do sêmen não alterou nenhum dos parâmetros da motilidade espermática e que entre as raças não existiu diferenças.

TULI & HOLTZ (1992) observaram diferenças significativas na motilidade computadorizada do sêmen fresco e pós-descongelamento nas espécies bovina, suína e caprina. Encontraram valores médios para motilidade progressiva computadorizada de 60% e 25% para o sêmen fresco e pós-descongelamento de caprinos, respectivamente. Este resultado está bem próximo aos do presente experimento, quando a motilidade progressiva pós-colheita foi de $64,32 \pm 2,26$ (Boer) e $62,38 \pm 4,73$ (Alpina) e pós-descongelamento de $21,45 \pm 3,41$ (Boer) e $22,31 \pm 3,15$ (Alpina), respectivamente. Valores superiores para os mesmos parâmetros no sêmen equino pós-descongelamento, 30,5 e 40,6%, foram encontrados por ARRUDA (2000) em diferentes diluidores.

Uma análise computadorizada de um grande número de ejaculados da espécie equina demonstrou que a principal diferença entre os garanhões está no tipo da motilidade (linearidade, índice retíneo, desvio lateral de cabeça e velocidade), revelando-se como o melhor método para diferenciar garanhões (FERREIRA, 1997). No entanto, neste observou-se que os parâmetros ALH, BCF, STR, LIN nas amostras pós-colheita e pós-descongelamento, colhidos no outono e na primavera e entre as raças foram semelhantes, exceto as velocidades.

As velocidades de trajeto, progressiva e curvilínea entre as amostras pós-colheita e pós-descongelamento apresentaram diferenças significativas. A VCL, VSL e o

número total de espermatozoides móveis pós-descongelamento inseminado foi positivamente correlacionado com a concepção. A importância da VCL e VAP como preditores de fertilidade podem concluir a capacitação espermática no processo de fertilização, pois ambos parâmetros são aumentados após a capacitação (VERSTEGEN et al., 2002).

MOSES et al. (1995) reportaram que a congelamento e descongelamento dos espermatozoides ovinos afetaram principalmente a linearidade da trajetória. Para os caprinos das raças estudadas não foi verificado este fato, nem quando comparou-se amostras. Provavelmente, o processo de criopreservação não tenha alterado este parâmetro, já que os valores da LIN foram numericamente bem próximos. No entanto, entre as estações, os valores da primavera apresentaram superiores, embora estatisticamente iguais.

ARRUDA (2000) relatou que em suas análises existiram fortes evidências que para os parâmetros motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, BCF, STR, LIN e velocidade rápida, quanto maior for o valor numérico, melhor a qualidade espermática para uma destas características estudadas. O oposto pode ser observado para o parâmetro da motilidade ALH, onde o valor numérico obtido significa pior qualidade espermática.

5.3.3 Morfometria da cabeça espermática

A classificação morfológica do espermatozoide tem se tornado parte integrante da moderna análise de sêmen em humanos, garanhões, touros e bodes. Uma pobre morfologia espermática é um importante indicador da diminuição da fertilidade em muitas espécies (GRAVANCE et al., 1995; GRAVANCE et al. 1998a).

A morfometria da cabeça dos espermatozoides caprinos das raças Boer e Alpina nas amostras pós-colheita e pós-descongelamento, outono e primavera, foi realizada utilizando-se um sistema computadorizado de análise de imagens denominado Image Pro- Plus (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Médias e desvios padrões ajustados por quadrados mínimos para a morfometria (μm) digitalizada (Image Pro-plus) da cabeça do espermatozóide caprino das raças Boer e Alpina, pós-colheita e pós-descongelamento, Botucatu-SP, 2002.

(mm)/Raças	Pós-colheita		Pós-descongelamento	
	Boer (n=1670)	Alpina (n=1298)	Boer (n=550)	Alpina (n=575)
Área (mm)	19,38±2,66 ^a	19,86±2,0 ^a	18,73±1,82 ^a	19,97±3,02 ^a
Perímetro(mm)	22,39±1,57 ^a	23,14±1,43 ^a	23,04±1,05 ^a	23,08±0,66 ^a
Comprimento(mm)	7,18±1,06 ^b	7,44±0,73 ^a	7,13±0,38 ^b	7,42±1,00 ^{ab}
Largura(mm)	3,80±0,74 ^a	3,78±0,71 ^a	3,78±0,73 ^a	3,80±0,64 ^a

Médias seguidas da mesma letra e linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P>0,01). n=número de observações para cada parâmetro

Tabela 7 Médias e desvios padrões ajustados por quadrados mínimos para a morfometria (μm) digitalizada (Image Pro-plus) da cabeça do espermatozóide caprino das raças Boer e Alpina, no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002.

(mm)/Raças	Outono		Primavera	
	Boer(n=1694)	Alpina (n=1252)	Boer (n=527)	Alpina (n=621)
Área (mm)	19,08±1,96 ^a	20,39±0,87 ^a	19,29±3,02 ^a	19,19±2,89 ^a
Perímetro(mm)	22,51±1,69 ^a	23,01±0,90 ^a	22,92±1,11 ^a	23,28±1,29 ^a
Comprimento(mm)	7,12±0,51 ^a	7,45±0,66 ^a	7,25±1,02 ^a	7,40±1,03 ^a
Largura(mm)	3,82±0,69 ^a	3,85±0,33 ^a	3,75±0,69 ^a	3,70±0,56 ^a

Médias seguidas da mesma letra e linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P>0,01). n=número de observações para cada parâmetro

Os valores médios da área, perímetro e largura da cabeça dos espermatozoides nas amostras pós-colheita não apresentaram diferenças significativas (P>0,01) quando comparada com a pós-descongelamento. Apenas para raça Alpina, o comprimento da cabeça espermática apresentou-se diferente das amostras pós-colheita e pós-descongelamento da raça Boer. Entre o outono e a primavera, todas médias ajustadas para morfometria para as raças Boer e Alpina não apresentaram diferenças estatísticas. GRAVANCE et al. (1995) avaliaram o efeito da congelamento nas dimensões da cabeça

espermática de caprinos e observaram que não havia diferença significativa ($P>0,01$) entre as dimensões da cabeça no sêmen fresco e congelado, concluíram que a congelação do sêmen não afeta as dimensões da cabeça do espermatozóide.

As médias das dimensões das cabeças espermáticas após a descongelação das raças Boer e Alpina foram semelhantes às medidas encontradas por GRAVANCE et al. (1995). Entretanto foram igualmente menores para o comprimento ($7,13\mu\text{m}$ [boer] e $7,42\mu\text{m}$ [alpina] vs $8,27\mu\text{m}$) e largura ($3,78\mu\text{m}$ [boer] e $3,80\mu\text{m}$ [alpina] vs $4,25\mu\text{m}$) que aos reportados por CUMMINS & WOODALL (1985) para espermatozóides caprinos, não relatando a raça. A diferença pode ser explicada pela utilização de diferentes técnicas de coloração (Figura 17). Estas variações nas dimensões da morfometria da cabeça espermática, baseada na técnica de coloração empregada tem sido apresentada em espermatozóides humanos (KATZ et al., 1988). Alternativamente, pode ser possível que as diferenças nas cabeças espermáticas de diferentes raças possam existir. Estas diferenças podem ser atribuídas a criopreservação e descongelação quando comparados com os resultados do sêmen fresco.

GRAVANCE et al. (1995) avaliando o efeito de duas diferentes técnicas de coloração (GZIN vs Hematoxilina) para mensurar a cabeça do espermatozóide caprino usando CellForm-humanTM, detectaram que não houve diferença entre os dois métodos de coloração utilizados na acuidade da digitalização das cabeças espermáticas dentro e entre os reprodutores. Erros de reconhecimento foram significativamente menores na coloração com a hematoxilina quando comparadas com GZIN.



Figura 17. Espermatozoides caprinos corados com hematoxilina (imagem digitalizada)
Aumento 1000x

5.3.4 Atividade Mitochondrial – atividade citoquímica

Os valores médios do número de espermatozoides e o índice de atividade citoquímica nas amostras pós-colheita e pós-descongelção, no outono e na primavera, distribuídos nas quatro classes de atividade, das raças Boer e Alpina, encontram-se nas Tabelas 8 e 9 e Figura 18.

Tabela 8. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para o número de espermatozoides e índice de atividade citoquímica (IAC), por classes, de acordo com HRUDKA (1987), avaliadas no sêmen caprino, pós-colheita e pós-descongelção, das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002.

Classes	Pós-colheita		Pós-descongelção	
	Nº Sptz (IAC)		Nº Sptz (IAC)	
	Boer (n=41)	Alpina (n=44)	Boer (n=38)	Alpina (n=41)
1	169 \pm 4 ^a (84,5)	169 \pm 4 ^a (84,5)	109 \pm 4 ^b (54,5)	107 \pm 3 ^b (53,5)
2	3 \pm 1 ^b (0,75)	2 \pm 1 ^b (0,5)	37 \pm 2 ^a (9,25)	48 \pm 1 ^a (12)
3	3 \pm 1 ^b (0,37)	7 \pm 1 ^b (0,93)	18 \pm 1 ^a (2,25)	14 \pm 1 ^a (1,75)
4	22 \pm 3 ^a (-)	25 \pm 3 ^a (-)	34 \pm 3 ^a (-)	34 \pm 3 ^a (-)
Total (%)	85,62	85,93	66,00	67,25

Médias seguidas da mesma letra e linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,01$). n=número de observações para cada parâmetro

Tabela 9. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para o número de espermatozoides e índice de atividade citoquímica (IAC), por classes, de acordo com HRUDKA (1987), avaliadas no sêmen caprino das raças Boer e Alpina, no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002.

Classes	Outono		Primavera	
	Nº Sptz (IAC)		Nº Sptz (IAC)	
	Boer (n=41)	Alpina (n=45)	Boer (n=38)	Alpina (n=40)
1	137 \pm 4 ^a (68,5)	135 \pm 3 ^a (67,5)	141 \pm 5 ^a (70,5)	140 \pm 4 ^a (70,0)
2	18 \pm 2 ^a (4,5)	23 \pm 1 ^a (5,75)	21 \pm 2 ^a (5,25)	27 \pm 1 ^a (6,75)
3	11 \pm 1 ^a (1,37)	9 \pm 1 ^a (1,12)	10 \pm 10 ^a (1,25)	8 \pm 8 ^a (1,0)
4	31 \pm 3 ^a (-)	31 \pm 3 ^a (-)	26 \pm 4 ^a (-)	23 \pm 3 ^a (-)
IAC (%)	74,37	74,37	77,00	77,75

Médias seguidas da mesma letra e linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,01$). n=número de observações para cada parâmetro

A análise de variância revelou que não houve diferença estatística entre amostras do outono e da primavera (Tabela 9), ocorrendo, entretanto, efeito significativo entre as amostras pós-colheita e pós-descongelção ($P<0,01$) nas classes 1, 2 e 3.

A distribuição de espermatozoides em várias classes, em diferentes frequências, demonstra a coexistência de espermatozoides com atividade normal, reduzida e ausente, confirmando a visão geral que um mesmo ejaculado apresenta uma multidão de espermatozoides compreendendo células intactas, senescentes e mortas (SALISBURY & VANDENMARK, 1961).

O índice de atividade citoquímica para amostras pós-colheita, raças Boer e Alpina, foram 85,62 e 85,93, enquanto que os índices para as amostras pós-descongelção foram 66,00 e 67,25, para raças Boer e Alpina, respectivamente. Estes índices significam que mais da metade das mitocôndrias estão ativas nos espermatozoides após a descongelção, o que é compatível para suportar o percentual de motilidade espermática quando avaliada após a descongelção. O índice de atividade citoquímica foi numericamente próximo ao verificado por BARBOSA & ESPER (1997) para o sêmen pós-descongelção de touros mestiços, que foi de 65,00 \pm 1,48%.

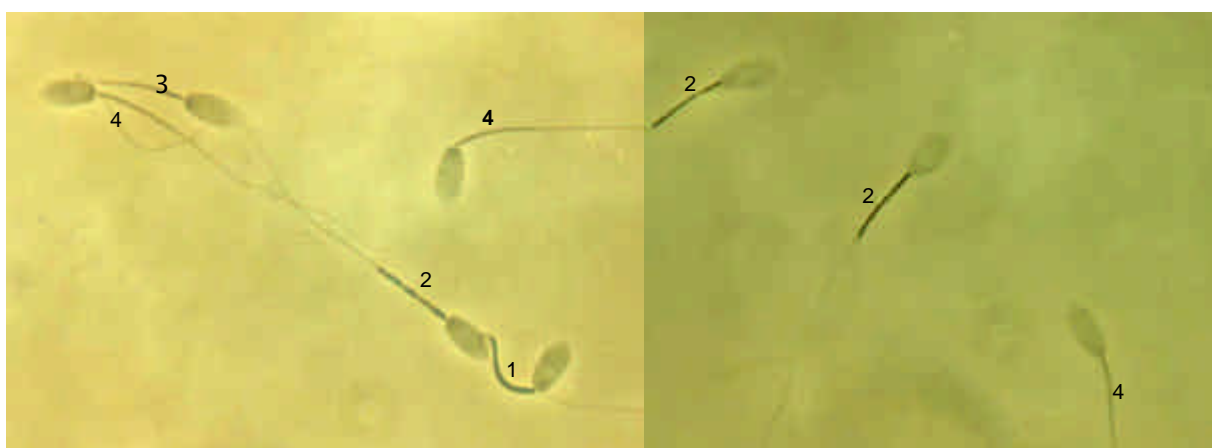


Figura 18. Espermatozoides caprinos corados com DAB. Categorias: 1-Mitocôndrias ativas; 2 - Mitocôndrias ativas > inativas; 3- Mitocôndrias ativas < nativas; 4- Mitocôndrias inativas. Aumento de 1000x.

5.3.5 Integridade da membrana plasmática do espermatozóide com sondas fluorescentes.

A preservação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide é crucial para sua capacidade fertilizante, especialmente após procedimentos de congelação e estocagem (PÉREZ et al., 2001), pois, a membrana é uma barreira semi-permeável para moléculas, mantendo assim, a composição molecular (BORG et al., 1997).

Várias técnicas foram desenvolvidas para verificar a integridade de membranas plasmáticas, dentre as quais: microscopia eletrônica de transmissão, varredura, amostras quimicamente fixadas, corantes supravitais e pelo uso de sondas fluorescentes (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 1997).

HARRISON & VICKERS (1990) na avaliação da integridade da membrana plasmática classificaram os espermatozóides em quatro categorias. Entretanto, neste estudo, foi observado um quinto padrão, semelhante ao encontrado por AZERÊDO et al. (2001), onde ocorria o acúmulo de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) em todo espermatozóide caprino, exceto na região da peça intermediária.

Para melhor entendimento e análise estatística, os resultados das cinco categorias da integridade de membrana foram classificados em: categoria 1, de íntegras ou normais; categorias 2, 3 e 4, de parcialmente lesadas; e categoria 5, de lesadas e estão apresentados nas Tabelas 10 e 11 e Figura 19.

Tabela 10. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para integridade da membrana plasmática de espermatozóides caprinos, por categorias, pós-colheita e pós-descongelamento, das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002.

Categoria	Pós-colheita		Pós-descongelamento	
	Sptz (%)		Sptz (%)	
	Boer(n=7600)	Alpina(n=8600)	Boer(n=7600)	Alpina(n=8600)
Íntegras ou Normais	97,80 \pm 2,71 ^a	94,61 \pm 6,27 ^a	20,33 \pm 15,03 ^b	30,01 \pm 17,57 ^b
Parcialmente danificados	1,56 \pm 14,92 ^a	4,61 \pm 15,73 ^a	77,47 \pm 5,69 ^b	66,52 \pm 43,77 ^b
Lesados	0,64 \pm 0,88 ^a	0,78 \pm 1,74 ^a	2,20 \pm 3,86 ^a	3,47 \pm 4,24 ^a
Total	100	100	100	100

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey
n= número de células.

Tabela 11. Médias e desvios padrões (\pm) ajustados por quadrados mínimos para integridade da membrana plasmática de espermatozóides caprinos, por categorias, outono e primavera, das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002.

Categorias	Outono		Primavera	
	Sptz (%)		Sptz (%)	
	Boer(n=8000)	Alpina(n=9600)	Boer(n=7200)	Alpina(n=7800)
Íntegras ou Normais	60,76 \pm 40,84 ^a	67,72 \pm 25,70 ^a	56,90 \pm 46,31 ^a	56,91 \pm 44,77 ^a
Parcialmente danificados	38,75 \pm 41,85 ^a	31,07 \pm 25,92 ^a	40,00 \pm 41,29 ^a	40,05 \pm 41,85 ^a
Lesados	0,49 \pm 0,79 ^a	1,21 \pm 1,68 ^a	3,05 \pm 4,37 ^a	3,04 \pm 4,51 ^a
Total (%)	100	100	100	100

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey
n= números de células

Houve diferença significativa entre as amostras pós-colheita e pós-descongelamento para as duas raças. O processo de criopreservação favorece a alteração da membrana plasmática como é relatado por vários autores, demonstrando assim a grande perda de espermatozoides pela criopreservação (MEDINA et al.,2000). Estas perdas incluem lesões das membranas plasmáticas, como acrossomal e mitocondriais, e foram detectadas por autores que estudaram danos de membranas após a criopreservação (HARRISSON & VICKERS, 1990; WATSON, 2000)

Embora as médias (%) de células íntegras ou normais pós-descongelamento de $20,33 \pm 15,03$ (Boer) e $30,01 \pm 17,57$ (Alpina) tenham sido baixas, a taxa de fertilidade foi compensada, provavelmente, pela alta concentração de espermatozoides viáveis de 300×10^6 mL favorecendo, assim, a fertilização. No entanto, as amostras no outono e primavera não apresentaram diferença, demonstrando que durante o período de colheitas, outono e primavera, nas duas raças estudadas, o espermatozoide não sofreu alteração na membrana plasmática.

MEDINA et al. (2000) encontraram médias da integridade de membrana plasmática de carneiros semelhantes ao deste trabalho na categoria de células íntegras ou normais no sêmen pós-descongelamento que foi 25,33 e inferior para o fresco de 67,58.

As médias de células íntegras e parcialmente lesadas deste estudo foram superiores e inferiores, respectivamente às encontrados por AZERÊDO et al. (2001) que avaliaram a integridade da membrana plasmática espermática de caprinos com e sem remoção do plasma seminal pós-colheita e pós-descongelamento. As médias (%) encontradas para células íntegras ou normais: $32,99 \pm 12,99$, $26,21 \pm 12,79$ e $3,11 \pm 2,76$ e $2,85 \pm 1,86$; lesadas: $57,54 \pm 11,43$, $60,19 \pm 12,54$ e $83,15 \pm 6,31$ e $83,36 \pm 4,87$; parcialmente lesadas: $9,72 \pm 5,09$, $10,46 \pm 2,45$ e $10,94 \pm 4,99$ e $\pm 10,24 \pm 3,13$ para o sêmen fresco e descongelado com e sem remoção do plasma seminal, respectivamente. Estes autores atribuíram as alterações da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides caprinos ao período de colheita e a remoção ou não do plasma seminal, utilizaram como diluidor o TRIS de acordo com o protocolo preconizado por Evans & Maxwell (1987) e uma concentração de 300×10^6 sptz/mL e

concluíram que o percentual de espermatozoides com membranas plasmáticas danificadas aumentou após a remoção do plasma e acentuou-se com a congelação e descongelação.

SÖDERQUIST et al. (1997), selecionando carneiros para programas de inseminação artificial, avaliaram a integridade da membrana do sêmen diluído em solução tamponada de TRIS-frutose-ácido cítrico, segundo a metodologia descrita por HARRISON & VICKERS (1990) modificada. Observaram que as amostras descongeladas a 70°C por cinco segundos ou 50°C por nove segundos apresentaram altas taxas de membranas plasmáticas espermáticas íntegras/normais ($50,5 \pm 1,5$ e $47,3 \pm 1,5$) quando comparou com as amostras pós-descongelação a 35°C por 12 segundos ($41,7 \pm 1,5$).

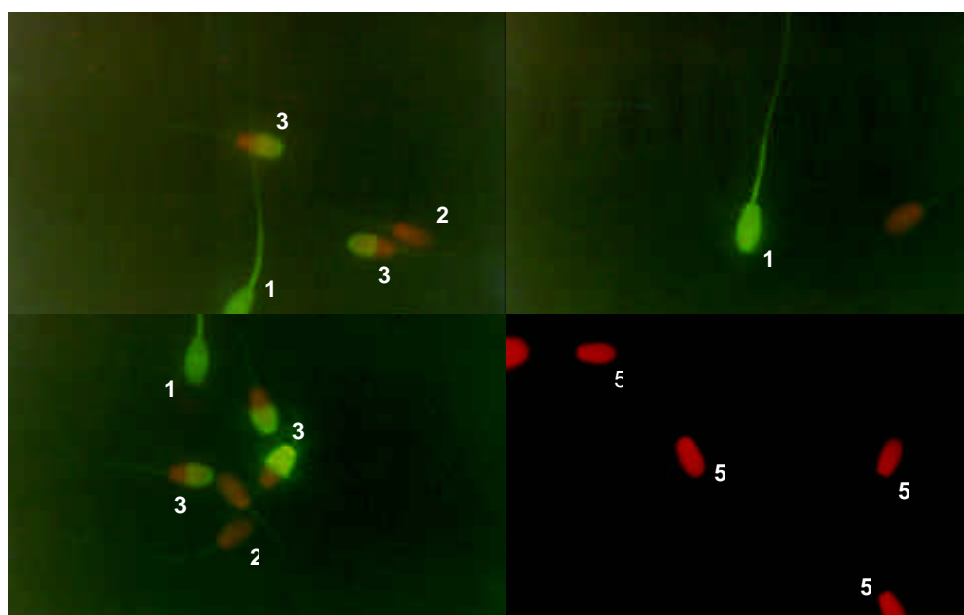


Figura 19. Espermatozoides corados com combinação DIC e IP. (1) Íntegros; (2, 3) Parcialmente danificado; (5) Lesados. Aumento de 1000x.

5.4 Dosagens de testosterona plasmática

Na espécie caprina, a sazonalidade desempenha um importante papel na produção de espermatozoides e este fato está diretamente relacionado com a secreção de testosterona. Portanto, ao se mensurar as concentrações plasmáticas de testosterona nas diferentes épocas reprodutivas pode-se ter uma noção das possíveis relações hormonais e a espermatogênese. Nas Tabelas 12 e 13 estão as mensurações plasmáticas de testosterona nas diferentes raças e estação reprodutiva e não reprodutiva.

Tabela 12. Concentrações plasmáticas médias (\pm e.p) de Testosterona em caprinos das raças Boer e Alpina, Botucatu-SP, 2002.

	Boer (n=62)	Alpina (n=62)
Testosterona (ng/dL)	339,39 (49,56) ^a	303,03(48,78) ^a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste t-Student (P>0,01)

Tabela 13. Concentrações plasmáticas médias (\pm e.p) de Testosterona em caprinos no outono e primavera, Botucatu-SP, 2002.

	Outono (n=67)	Primavera (n=57)
Testosterona (ng/dL)	346,70(45,22) ^a	288,57(53,87) ^a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste t-Student (P>0,01)

As concentrações plasmáticas médias de testosterona entre as raças foram de 339,39ng/dL e 303,03ng/dL para raças Boer e Alpina, respectivamente, e entre as estações de 346,70ng/dL para o outono (abril – maio) e e 288,57ng/dL para a primavera (outubro e novembro). Estes níveis hormonais proporcionaram uma produção espermática de uma mesma qualidade durante os períodos das colheitas. As concentrações plasmáticas de testosterona para os bodes das raças Boer e Alpina nas estações outono e primavera não apresentaram diferenças significativas.

Entretanto, apesar dos resultados não serem significativamente expressivos, notou-se uma tendência dos animais da raça Boer apresentarem níveis plasmáticos de testosterona acima dos animais da raça Alpina. Provavelmente, deva-se a sua origem africana, onde também não sofrem influência do fotoperíodo (MALAN, 2000).

Outro importante aspecto a ser considerado foi o fato dos animais apresentarem níveis plasmáticos de testosterona durante o outono levemente maior que na primavera, contribuindo provavelmente, para que todos os testes *in vivo* e *in vitro* realizados no sêmen colhido nesta estação mostrassem superioridade aos colhidos na primavera, embora estatisticamente não significativo.

MANDIKI et al. (1998) indicaram que a melhor qualidade do sêmen e a mais alta capacidade reprodutiva são observadas durante a estação sexual que pode estar relacionada com altos níveis plasmáticos de testosterona e secreção de LH. Inversamente, a diminuição na pulsatilidade desses hormônios pode contribuir para a baixa eficiência da espermatogênese observada na primavera. SOUZA (1999) quantificou as concentrações de testosterona de carneiros da raça Ideal ao longo de um ano e concluiu que as concentrações não evidenciavam ritmos circadianos, porém demonstravam ritmos circanuais, onde os níveis mais baixos ocorrem nos meses de junho a outubro, enquanto os mais altos, de dezembro a abril, concluindo que o sêmen dos carneiros apresentava qualidade nas suas características seminais durante todo o ano, o que permitia sua congelação.

Flutuações nos níveis plasmáticos deste hormônio estão associadas com alterações no fotoperíodo e estas variações na concentração de testosterona são responsáveis pela diferença sazonal na produção espermática e composição das glândulas sexuais acessórias e, conseqüentemente, na qualidade do sêmen (BORQUE & SAGÜES, 1993).

Em decorrência da pouca variação diária da luminosidade existente nas condições do experimento, os bodes das raças Boer e Alpina podem ter adquirido um ritmo endógeno que permitiu a conservação das características reprodutivas quantitativas do sêmen e os níveis hormonais, dentro das duas estações.

5.5 Sincronização do estro

Das 170 cabras SRD submetidas ao tratamento considerado “protocolo padrão” de sincronização e indução do estro, 144 fêmeas (84,7%) manifestaram estro evidente, 24 horas e 26 (15,29%) em 34-36 horas após a retirada das esponjas, indicando portanto, que o protocolo adotado foi eficaz. Resultados semelhantes foram apresentados por MOTLOMELO et al. (2002) que encontraram um índice de 97% de manifestação de estro em cabras após o tratamento com três tipos de progestágenos, concluindo que todos foram igualmente eficientes, e observaram uma média de intervalo da retirada do progestágeno até o início de estro de $30,1 \pm 5,5$ h.

Cabras não lactantes da raça Toggenburg foram submetidas a dois protocolos de indução de estro, os quais consistiam na deposição de esponjas intravaginais contendo 60mg de medroxiprogesterona (Progespon[®], Tecnopec, Brasil) por seis (T1) e nove dias (T2), respectivamente, mais 200UI de gonadotrofina coriônica de égua prenhe (eCG - Novorm[®], Syntex, Argentina) e 22,5 µg de d-cloprostenol (Prolise, Tecnopec, Brasil) 24 horas antes da remoção das esponjas manifestaram estro 89,5% (T1) e 84,2% (T2) das fêmeas tratadas manifestando estro e não diferindo estatisticamente (FONSECA et al., 2003).

LAWRENZ (1987) sincronizou o estro de um grupo de fêmeas de esponjas intravaginal impregnadas com acetato de fluorogestona (FGA) por 11 dias e 48 horas antes da remoção da esponjas aplicou por, via intramuscular, uma prostaglandina (LUPROSITOL[®] – 7,5mg) e eCG (450UI). As fêmeas foram inseminadas 31 e 48 h após a retirada das esponjas. No presente experimento utilizando como progestágeno o MAP, realizou-se a inseminação em 34-48 h após a remoção.

5.6 Inseminação artificial

O sucesso da fertilização depende do momento da inseminação ocorrer próximo à ovulação. Altas taxas de fertilização estão relacionadas com o momento da fertilização, com duração do transporte espermático no trato genital feminino e com tempo de sobrevivência dos gametas masculino e feminino (LEBOEUF et al. 2000).

Das 170 fêmeas selecionadas, foram inseminadas 164 num intervalo entre 34-48 h após a retirada das esponjas e 10-12 h após início do estro. O teste χ^2 mostrou que não houve diferença estatística ($P>0,01$) na taxa de fertilidade para o sêmen colhido no outono e na primavera (Tabela 14).

Tabela 14. Taxa de fertilidade (%) de fêmeas Sem Raça Definida (SRD) inseminadas com sêmen congelado de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e na primavera, São Mateus-MA, 2003.

Raça	Outono %			Primavera %			Total %	
	n	P	NP	n	P	NP	P	NP
Boer	44	26,74(23) ^a	24,42(21) ^a	42	19,77(17) ^a	29,07(17)	46,51(40) ^a	53,59(46) ^a
Alpina	42	34,62(27) ^a	19,23(15) ^a	36	29,49(23) ^a	16,67(13) ^a	64,11(50) ^a	35,9(28) ^a

P=prenhe, NP=não prenhe; n=(número de animais)

Importantes informações puderam ser extraídas quando se avaliou os resultados desta tabela. As fêmeas inseminadas com o sêmen congelado de reprodutores da raça Alpina apresentaram taxa de prenhez maior que os da raça Boer independente da estação do ano. Este fato talvez possa ser atribuído a uma melhor viabilidade das células espermáticas pós-descongelamento para estes reprodutores.

Quando se avaliou a estação do ano, notou-se que o sêmen oriundo da congelamento no outono apresentou um número maior de fêmeas prenhes do que aquele congelado na primavera, independente das raças em questão, entretanto sem diferir estatisticamente. Cabe ressaltar que, apesar dos resultados não terem sido significativos, ao avaliar o percentual de animais prenhes entre as estações, notou-se

que houve um aumento de 12% fêmeas prenhes com o sêmen congelado no outono em relação ao da primavera e isto é economicamente lucrativo.

Valores das taxas de fertilidade, com sêmen congelado com TRIS gema, próximo ao deste estudo foram encontrado por LAWRENZ (1987) em cinco experimentos com inseminação artificial intra-uterina não cirúrgica com taxas de fertilidade de 60,8%, 70,9%, 62,3% e 62,8% em fêmeas apresentando estro natural e 60,4 em fêmeas submetidas ao tratamento hormonal de sincronização e indução da ovulação. Observados por CORTEEL et al., (1987) de 63% para a inseminação intra-uterina e 52,2% para as fêmeas inseminadas duas vezes na cérvix com sêmen congelado, e RESENDE & WEITZE (1987) após inseminação artificial intra-uterina em fêmeas caprinas obtiveram um percentual de parição de 52% usando como diluidor do sêmen o TRIS, o protocolo usado neste experimento. E por CORDEIRO et al. (2003) testando a viabilidade *in vivo* do sêmen caprino congelado com TRIS ou em ACIN *in natura* por inseminações artificiais, obtiveram fertilidade de 40,63% em TRIS e 47,69% em ACIN. As fêmeas tiveram estros sincronizado pelo tratamento hormonal e inseminadas 40-44 horas após a retirada das esponjas.

6. CONCLUSÕES

De acordo com as condições do experimento, com os resultados obtidos e a análise estatística, pode-se concluir que:

- O sêmen de reprodutores caprinos das raças Boer e Alpina apresentou boas características quanti-qualitativas durante a estação reprodutiva (outono) e não reprodutiva (primavera), o que permite a sua congelação adequada e fecundidade posterior .
- Não houve diferença estatística nas concentração plasmática de testosterona nem entre as raças e nem entre estações.
- A estação reprodutiva ou não reprodutiva não influenciou na Integridade da cromatina, na motilidade espermática computadorizada, na morfometria espermática, no índice de atividade citoquímica e na integridade da membrana plasmática do espermatozóide.
- A congelação/descongelação não afetou a morfometria da cabeça dos espermatozóides.
- Nas condições do estudo, os machos caprinos das raças Boer e Alpina não apresentaram comportamento reprodutivo estacional.

7. REFERÊNCIAS

ANOSA, V.O.; ISOUN, T.T. Further observations on the testicular pathology in trypanosoma vivax infection of sheep and goats. **Research Veterinary Science**. v. 28, p.151-160, 1980.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 121f. Tese (Livre Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo 2000.

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**, Amsterdam, v. 41, p.257-263, 2001.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, England, n. 1, v. 21, , p. 1-7, 2000.

BALLACHEY, B.E.; EVENSON, D.P.; SAACKE, R.G. The sperm chromatin struture assay: relationship with alternative tests of semen quality and heterospermic perfomance of bulls. **Journal of Andrology**, England, n. 2, v. 36, p.109-115,1988.

BARBOSA, R.T.; ESPER, C.R. Avaliação e demonstração da atividade citocromo c oxidase em espermatozóides bovinos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, n. 3, v.13, , p.218-223, 1997.

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. **Manuel de formation pratique pour la transplation embryonnaire chez la brebis et la chèvre**. Rome: FAO, 1993, 175p.

BAKER, H.W.G.; CLARKE, G.N. Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. **Clinical Reproduction and Fertility**, Australia, v. 5, p. 37-43, 1987.

BLOM, E. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske spermiedefekter og forslag til et nyt klassificeringssystem for tyrens spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, Sweden, v. 25, p. 383-391, 1973.

BLOTTER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, Australia, v. 65, p. 75-88, 2001.

BORG, K.; COLENBRANDER, B.; FAZELLI, A.; PARLEVLIT, J.; MALMGREN, L. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 48, n. 34, p.531-536, 1997.

BORQUE, C. Variación estacional de algunos componentes bioquímicos del eyaculado de moruecos de raza Manchego. In: JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL, 11, 1991, Zaragoza. **Proceedings...** p. 43-45.

BORQUE, C.; SAGÜES, A. Variaciones estacionales de los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. **Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales**, Madrid, v. 7, n. 3, p. 235-240, 1992.

BORQUE, C.I.; NAVARIDAS, A.S. Variaciones estacionales de los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. **Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales**, v. 7, n. 3, p. 1992.

BORQUE, C.; SAGÜES, A. Influencia de la estación del año en las concentraciones de testosterona plasmática y en la composición bioquímica del eyaculado de moruecos de raza Manchega. In: JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL, 12., 1993, Zaragoza. **Proceedings...** p. 468-470.

BORQUE, C.; VÁSQUEZ, I.; SAGÜES, A.; GARCÍA, C.; GARDE, J. Influence of photoperiod in biochemical tracers of semen. In: ANNUAL MEETING OF THE EAAP, 2., 1992, Madrid. **Proceedings...** p. 273.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 26, p. 211-252, 1964.

BROWN, S.W.W.; RESTALL, B.J. Environmental and social factors affecting reproduction. In: International Conference on Goats, 6, 1996, Beijing. **Proceedings...** v.2, p. 762-775.

CARMENATE, P.C.; GAMNČIK, P. Physical and morphological properties of ram semen in different seasons. **Folia Veterinaria Bratislava**, Kosice, v. 26, p. 39-52, 1982.

CHEMINEAU, P.C.; COGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome: FAO, 1991. p. 222.

COLAS, G.; LEFEBVRE, J.; GUÉRIN, J. Etude de la transmission père-fils des variations saisonnières du diamètre testiculaire et du pourcentage de spermatoïdes anormaux chez le bélier Ile-France: 1. Filnés en février. **Reproduction Nutritional Development**, Paris, v. 30, p. 589-603, 1990.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, manual, Belo Horizonte, 1998. 49p.

CORDEIRO, M.A.; SALGUEIRO, C.C.M.; MAGALHÃES, D.M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E. Avaliação da fertilidade de cabras inseminadas com sêmen congelado de bodes diluído em "TRIS" ou em água de coco *in natura*. **Revista Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31 suplemento 1, p.298, 2003.

CORREA, J.R.; PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. **Theriogenology**, New York, v. 48, p. 721-731, 1997.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose. **Annales de Biologie Animale Biochimic Biophysic**, v.14, n.4, p.741-745, 1974.

CORTEEL, J.M.; PAQUIGNOM, M. **Preservation of the male gamete (ram, buck and boar)** In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND A.I. 10, 1984, Urbana, p.11-27.

CORTEEL, J.M.; BARIL, G.; LEBOEUF, B. Development and application of artificial insemination with deep frozen and out-of-season breeding of goats in France. In. INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4, 1987, Brazilia. **Proceedings...**p.523-547.

CUMMIMS J.M., WOODALL, P.F. On mammalian sperm dimensions. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 153-175, 1985.

ESPESCHIT, C.J.B. Alternativas para controle da estacionalidade reprodutiva de cabras leiteiras. In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 5., 1998, Botucatu, SP. **Anais...** p.7-33.

EVENSON, D.P., DARZYNKIEWICZ, Z., MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; SANTOS, I.C.C.; VIANA, J.H.M.; MAGALHÃES, A.C.M.; MAFFILI, V.V.; MORAES, E.A. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17, 2003. **Anais...** p.366.

FERREIRA, J.C.P. Avaliação computadorizada da motilidade e concentração espermáticas. In: JORNADA DE INTEGRAÇÃO DOS ALUNOS DE GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL, 1997, Botucatu, SP. **Anais...** p.1-14.

FUENTES, V.O.; FUENTES, P.; GARCIA, A. The effect of naloxone on plasma concentrations of testosterone in male goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 27, p. 173-176, 1998.

GONZALEZ, R.; ORGEUR, P.; SIGNORET, J.P. Luteinizing hormone, testosterone and cortisol responses in rams upon presentation of estrous females in the nonbreeding season. **Theriogenology**, New York, v. 30, p. 1075-1086, 1988.

GRAVANCE, C.G., CHAMPION, Z.J., CASEY, P.J. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of criopreservation ram spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 49, p. 1219-1230, 1998a

GRAVANCE, C.G.; LEWIS, K.M.; CASEY, P.J. computer automed sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 44, p. 989-1002, 1995.

GRAVANCE, C.G.; WHITE, C.; ROBERTSON, K.R.; CHAMPION, Z.J.; CASEY, P.J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. **Animal Reproduction Science**, Australia, v. 49, p. 37-43, 1997.

GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT.; C.; GARNER, D.G.; CASEY, P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphology. **Journal of Andrology**, England, n. 6, v. 19, p. 704-709, 1998b.

GREYLING, J.C., GROBBELLAAR, J. A. N. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goats ram using different collection techniques. **South African Journal Animal Science**, n. 4,v. 13, p.250-252, 1983.

HARRISSON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 1,v. 88, p.343-352, 1990.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, New York, v. 53, p. 47-58, 2000.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 6, p. 809-828, 1987.

IRTANI, A. Problems of freezing spermatozoa of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND A.I, 9, 1980, Madrid. **Proceedings...** p.21.

IRITANI, A.; NISHIKAWA,Y. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen.VI. On the chemical properties of the ejaculated semen and the secretion of accessorysexual organs on the goat. **Japan Journal Animal Reproduction**, Japan, v. 10, n. 2, p. 44-51, 1964.

IRITANI, A.; NISHIKAWA,Y. NAGASAWA, S. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen.VII.Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season, and in each ejaculate collected three successively. **Japan Journal Animal Reproduction**, Japan, n. 2, v. 10, p.52-56, 1964.

IRVINE, D.S.; TWIGG, J.P.; GORDON, E.L.; FULTON, N.; MILNE, P.A.; AITKEN, R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **Journal of Andrology**, England, v. 21, n. 1, p. 33-44, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L. HAARD, M.G.M.; HAARD, M.Ch.; JOHANNNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bulls semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, New York, v. 52, p. 641-658, 1999.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. **Theriogenology**, New York, v. 53, p. 1285-1293, 2000.

KATANGOLE, C.B.; NAFTOLIN, F.; SHORT, R.V. Relationship between blood levels sexual stimulation. **Journal Endocrinology**, v. 50, p. 457-466, 1971.

KATZ, D.F., OVERSTREET, J.W., SAMUELS, S.J., NISWANDER, P.W., BLOOM, T.D., LEWIS, E.L. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**, England, v. 11, p. 379-394, 1988.

KOLIBIANAKIS, E.M.; TARLATZIS, B.C.; BONTIS, J.; PAPADIMAS, J.; SPANOS, E.; MANTALENAKIS, S. Evaluation of Hamilton-thorne automated semen analysis system. **Archives of Andrology**, London, v. 28, p. 213-222, 1992.

LANGFORD, G.; SHERESTHA, N. Seminal vesicle activity during cyclic or stabilized testicular activity in rams. **Animal Reproduction Science**, Australia, v. 24, p. 85-91, 1991.

LAWRENZ, R. Insemination of angora and boer with frozen semen. In. INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4, 1987, Brazilia. **Proceedings...**p.1503.

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

LINCOLN, G.A.; LINCOLN, C.E.; McNELLY, A.S. Seasonal cycles in blood plasma concentrations of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams and the influence of photoperiod. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 623-633, 1990.

LLANO, P.B, MATEOS-REX, E. Influence of photoperiod on the secretion of testosterone as a response to sexual stimulus male goats. **Theriogenology**, New york, v.42, p.127-135, 1994.

MALAN, S.W. The improved Boer goat. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.36, n.2, p.165-170, 2000.

MANDIKI, S.N.M.; DERYCKE, G.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. Influence of season and age on sexual maturation parameters in Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. 2. Circulating concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactine and testosterone. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 28, p. 81-88, 1998.

MARTINS, C.F.; UNANIAN, M.M.; FELICIANO SILVA, A.E.D. Avaliação da cromatina espermática em touros: um importante teste para determinação da qualidade do espermatozóide. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, v. 28, suplemento. 1, p. 286, 2000.

MATEOS, E.; ZUBIETA, M. Influencia del estímulo sexual en los niveles de testosterona plasmática de machos cabríos. **Investigacion Agraria: Producción Sanidad Animales**, v. 5, p. 109-119, 1990.

MEDINA, V.H.; VICENTE, W.R.R.; ESPER, C.R.; MALHEIROS, E.B. Uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após congelação. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, n.3, v. 16, p. 204-209, 2000.

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

McLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L. Effects of cryopreservation on the intracellular calcium concentration of human spermatozoa and its response to progesterone. **Molecular Reproduction Development**, v. 37, p. 241-246, 1994.

MILLER, D.J.; DEMERS, J.M.; BRAUNDMEIER, A.G.; BEHRENS, M.L. The use of two fluorescent dyes to identify sperm in a competitive binding assay to oocytes. **Journal of Andrology**, England, v. 19, n. 6, p. 650-656, 1998.

MOSES, D.F.; LAS HERAS, M.A.; VALCÁREL, A.; PÉREZ, L.; BALDASSARE, H. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v. 27, p. 25-29, 1991.

MOTLOMELO, K.C.; GREYLING, J.P.C.; SCHWALBACH, L.M.J. Synchronisation of estrus in goats: the use of different progestagen treatments. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 45, p. 45-49, 2002.

MULLER, C.H. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. **Journal of Andrology**, England, v. 21, n.1, p.10-30, 2000.

NUNES, J.F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. Sobral EMBRAPA, 1982. 41p, (Circular Técnica 5).

NUNES, J.F.; FERNANDEZ, D.R.P. **Biotécnicas dela reproduction caprina y ovina**. Fortaleza: Gráfica y Editora 2M, 2001. p.175.

NUNES, J.F.; CIRÍACO, A.L.T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2. ed. Fortaleza: Editora Gráfica LCR, 1997. p.199.

PÉREZ, B.; MATEOS, E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of vat and malagueña breeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, n. 2, v. 22, p.163-168, 1996.

PÉREZ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 56, p. 425-434, 2001.

PHILLIPS, R.W.; FRAPS, R.M.; FRANK, A.H. Hormonal stimulation of estrus and ovulation in sheep and goats. **American Journal Veterinary Research**, v.6, p.165-175, 1945.

PINEDA, M.H. Male Reproduction. In: McDONALD, L.E.; PINEDA, M.H. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4 .ed. London: Lea & Fasiger, 1989, 571p.

RESENDE, J.; WEITZE, K.F. Congelamento de sêmen de caprino com diluente tris modificado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24, 1987, Brasília. **Anais...**p.381.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of month collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angorá goat spermatozoa. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 4, p. 29-37, 1991.

ROCA, A. J.; MARTINEZ, E.; SANCHEZ-VALDERDE, M.A.; RUIZ, S.; VASQUEZ, J.M. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. **Theriogenology**, New York, v. 38, p. 115-125, 1992.

RODRIGUEZ, H.; BUSTOS-OBREGON, E. Seasonality and freezability vs routine parameters in stallion semen. **Histology&Histopathology**, v.11, p.427-430, 1996.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, n.1-3, v.9, p.297-308, 1997.

SAS INSTITUTE. **SAS: Statistcs**: Version 6.10 ed. Cary, 1995. 295p.

SALISBURY, G.W.;VANDERMARK, N.L. **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle**. San Francisco: W.H.Freeman, 1961, 361 p.

SODERQUIST, N.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ. Assessment of ram membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, New York, v. 48, p. 1115-1125, 1997.

SOFIKITIS, N.; MIYAGAWA, I.; ZAVOS, P.M. Seletion of single-strand desoxyribonucleic acid spermatozoa via the spermPrep filtration column. **Fertility and Sterility**, USA, n. 3, v. 59, p.690-692, 1993.

SOUZA, M.I.**Congelabilidade do sêmen e ritmos de secreção de testosterona, androstenediona, triiodotironina e tiroxina, ao longo do ano, em carneiros ideal em Botucatu-SP**.1999. 120f. Tese (Doutorado) em Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, USA, n. 1, v. 42, p. 87-91, 1984.

TRALDI, A.S. **Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos**; manual, São Paulo:[s.n] 1994. 54p.

TULI, R.K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. **Theriogenology**, New York, v. 38, p. 487-490, 1992.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyses in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 149-179, 2002.

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

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

WHITHFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A 23187). **Theriogenology**, New York, v. 44, p. 413-422, 1995.

ZLATAREV,S.T., MITEVA, K., KICHEVA, M., PIRONCHEVA, G. The influence of season on some biological properties of ram spermatozoa and on the possibilities to prognosticate their fertility rate. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 13, 1996, Sydney. **Proceedings...**p1-3.

8. APÊNDICE

1. Composição do diluidor

A. TRIS mãe

Tris (hydroximetilaminometano)	3,08g
D-frutose	1,25g
Ácido cítrico	1,78g
Água destilada	94mL

B. TRIS caprino

Tris mãe	70%
Gema de ovo	17%
Glicerol	5%
Água destilada	8%
Sulfato de neomicina	13,33mg/mL diluente

2. Método acridine orange

A. Solução estoque

Acridine orange (3,6,bis[Dimethylamino]acridine)	1g
Água destilada qsp	1000mL

Mantido em frasco âmbar, a 4°C

B. Solução corante

Solução corante	1mL
Ácido cítrico 0,1M	40mL
Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,3M	2,5mL

Guardado em temperatura ambiente. Preparado diariamente com pH final de 2,5.

C. Solução de Carnoy (fixação)

Metanol (PA)	2/3
Ácido acético glacial (PA)	1/3

Fixado de um dia para outro ("overnight")

3. Composição das soluções para avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide caprino sob microscopia de fluorescência.

A. Preparo da solução estoque salina.

Componentes	g/100mL
NaCl*	0,8183
Glicose***	0,0186
KCl*	0,1799
Álcool polivinílico**	0,0500
Polivinilpirrolidona	0,0500
HEPES (3375)**	0,2383
HEPES (7006)** sal de sódio	0,2603

O pH ajustado para 7,55 com NaOH* a 1N e a solução estocada a 4°C por três meses.

B. Preparo da solução de formaldeído

Formaldeído a 37%*	0,0250g
Água Destilada	10mL

Preparada imediatamente antes de cada experimento

C. Preparo da solução estoque de Iodeto de Propídio.

Iodeto de Propídio**	0,0005g
Solução salina isotônica	1mL

D. Preparo da solução estoque de Diacetato de Carboxifluoresceína.

Diacetato de Carboxifluoresceína**	0,0005g
Dimetilsulfóxido*	1mL

Ambas soluções (itens C e D) foram estocadas a -20°C , em local escuro, por tempo indeterminado.

E. Preparo da solução corante (meio de coloração).

Solução estoque de Iodeto de propídio	10 μL
Solução estoque de Diacetato de Carboxifluoresceína	20 μL
Solução de Formaldeído	20 μL
Solução estoque salina	1mL

A solução corante foi preparada, no máximo, 1 hora antes do uso.

*MERCK, Rio de Janeiro – Brasil.

**SIGMA, Chemical Co., MO, USA.

***Laboratórios INLAB