UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ADIÇÃO DE TROLOX® E CATALASE AO MEIO GLICINA-GEMA-LEITE SOBRE O SÊMEN CAPRINO REFRIGERADO POR 24 OU 48 HORAS EM SISTEMA EQUITAINER®

SABRINA MISSAE SAKASHITA

BOTUCATU - SP
Agosto - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ADIÇÃO DE TROLOX® E CATALASE AO MEIO GLICINA-GEMA-LEITE SOBRE O SÊMEN CAPRINO REFRIGERADO POR 24 OU 48 HORAS EM SISTEMA EQUITAINER®

SABRINA MISSAE SAKASHITA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU - SP
Agosto - 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Sakashita, Sabrina Missae.

Efeito da adição de Trolox® e Catalase ao meio Glicina-Gema-Leite sobre o sêmen caprino refrigerado por 24 ou 48 horas em sistema Equitainer® / Sabrina Missae Sakashita. – Botucatu :[91.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Capes: 50504002

1. Caprino - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Refrigeração. 4. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidante; Refrigeração, Sêmen caprino.

Nome do autor: Sabrina Missae Sakashita

Titulo: EFEITO DA ADIÇÃO DE TROLOX® E CATALASE AO MEIO GLICINA-GEMA-LEITE SOBRE O SÊMEN CAPRINO REFRIGERADO POR 24 OU 48 HORAS EM SISTEMA EQUITAINER®.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ - UNESP - Câmpus Botucatu

_____
Prof. Dr. Daniel Bartoli de Sousa
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Obstetrícia Animal
Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP

_____
Prof. Dr. Cezinande Meira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ - UNESP - Câmpus Botucatu

Data da Defesa: 25 de agosto de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que de alguma maneira fizeram parte de tudo isso, desde o seu início.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais: Cecília e Yoshihiro aos quais desde o início apoiaram meus estudos e sempre incentivaram minhas idéias e decisões. Minha família, avós, tios, tias, primos e primas, irmão e sobrinha que durante este período apoiaram minhas viagens a Botucatu e sempre estavam dispostos a ouvir meus discursos sobre caprinocultura.

Aos professores e orientadores da UFPEL - RS que desde a graduação sempre me apoiaram e me conduziram da melhor forma ao campo científico e profissional, aos amigos do Sul que sempre torceram por minhas conquistas.

Aos Pesquisadores, orientadores e amigos: Médico Veterinário Carlos Frederico Rodrigues e ao Zootecnista João Elizário Iapichini, os quais me apresentaram durante o estágio realizado em meados de 2004 na UPD/APTA - unidade de Itapetininga, ao mundo da caprinocultura e ser mais uma fã desse setor e desde então, sempre apoiaram e incentivaram-me na área de pesquisa e na área profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo por ter me aceitado como orientanda desde o início, sem qualquer conhecimento prévio e por ter acreditado em minha capacidade de pesquisa e no desafio do estudo em caprinos (bodes) e por fornecer todos os subsídios necessários para a execução de nossa pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos, ao Marcel B. Falleiros que compartilhou o laboratório durante nossos experimentos, a Claudinha (Cláudia D. Monteiro) que sempre ajudou e sempre muito prestativa, em todas as horas de estresse e decepções e também durante as horas de comemorações. A amiga de mestrado Letícia F. Crocomo que foi parceira e por diversas vezes nos ajudamos durante nossos experimentos, ao Alemão: Leandro Rodello, que desde o início sempre foi prestativo e atencioso para comigo e com meu experimento, auxiliando diversas vezes e esclarecendo muitas dúvidas do decorrer do experimento.

Não podendo esquecer os estagiários, que passaram pelo Laboratório, Ricardo Favero e a Tácia Bergstein que durante o estágio final foram muito prestativos e participativos colaborando na execução do experimento.

Aos novos amigos conquistados durante essa etapa, Natália P.P.Freitas, Leandro Maia e Gabriel A. Monteiro, que sempre aceitavam meus convites de lanchinhos ao fim das tardes, mesmo quando o “cheirinho” característico de bode era insuportável, aos colegas de departamento Bruna De Vita, Bianca A. Monteiro, Camila L. Ackermann, Eduardo Trevisol, Fernanda Saules, Jair C. Ferreira, Ian Martin, Loreta L. Campos, Priscila N. Guasti, Aline Rocha, Rodrigo Volpato e a todos que convivi intensamente nos corredores e em festas da FMVZ/UNESP.

A Poty, Banespa e Larika que me acolheram na República Whiskas, compartilhando de longas horas de conversas e risadas durante essa etapa, demonstrando a amizade verdadeira.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, por disponibilizar as suas instalações, laboratórios e equipamentos para o desenvolvimento do projeto; e aos professores e funcionários do Departamento por sempre terem ajudado quando necessário.

Aos criadores de caprinos, Sr. Célio de Melo Almada, Srs. Reinaldo e Manoel Faia, Sr. Hélio Duarte, a UPD/ APTA - Itapetininga- SP e ao Professor Dr. Heraldo César Gonçalvez, FMVZ/UNESP por colaborarem com o empréstimo dos bodes para a realização do experimento.

A CAPES ao apoio financeiro na concessão da bolsa durante o mestrado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Ninguém é tão ignorante que não tenha algo a ensinar.
Ninguém é tão sábio que não tenha algo para aprender ”
(Blaise Pascal)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Médias ± desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado e morfologia espermática do sêmen caprino *in natura* e diluído pré- refrigeração nos meios Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite (GGL) e Glicina-Gema-Leite suplementado com Trolox® e Catalase (GGL_{tc})……. 30

TABELA 2: Médias ± desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT) e Progressiva (MP) avaliados no sistema computadorizado CASA do sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema- Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 32

TABELA 3: Médias ± desvio padrão dos parâmetros de velocidade de trajeto (VAP); Velocidade progressiva (VSL) e Velocidade curvilinear (VCL) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 34

TABELA 4 Médias ± desvio padrão dos parâmetros da Amplitude lateral da cabeça (ALH); Freqüência de batimento do flagelo (BCF); Retilinearidade (STR); Linearidade (LIN), avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 36

TABELA 5 Médias ± desvio padrão dos parâmetros de integridade total de membrana espermática em microscopia de epifluorescencia, morfologia espermática - Acrossomo (lesado) e Cauda (caudas dobradas), no sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementada com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 38

TABELA 6 Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino, durante o Teste de Exaustão Pós-Refrigeração de 24 horas, nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 41

TABELA 7 Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de velocidade de trajeto (VAP); Velocidade progressiva (VSL) e Velocidade curvilinear (VCL) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão Pós-Refrigeração de 24 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 43

TABELA 8 Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos da Amplitude lateral da cabeça (ALH); Freqüência de batimento do flagelo (BCF); Retilinearidade (STR); Linearidade (LIN), avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão Pós-Refrigeração de 24 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 44

TABELA 9 Médias ± desvio padrão dos parâmetros de integridade total de membrana espermática em microscopia de epifluorescencia, morfologia espermática - Acrossomo (lesado) e Cauda (caudas dobradas), no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 24 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 45

TABELA 10 Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino, durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas, nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})..... 47

TABELA 11 Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de velocidade de trajeto (VAP); Velocidade progressiva (VSL) e Velocidade curvilinear (VCL) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})..... 48

TABELA 12 Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos da Amplitude lateral da cabeça (ALH); Freqüência de batimento do flagelo (BCF); Retilinearidade (STR); Linearidade (LIN), avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})..... 49

TABELA 13 Médias ± desvio padrão dos parâmetros de integridade total de membrana espermática em microscopia de epifluorescencia, morfologia espermática - Acrossomo (lesado) e Cauda (caudas dobradas), no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas nos meios diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc})…… 50

LISTA DE FIGURAS

GRÁFICO 1	Curva de refrigeração do Equitainer® 1 e 2	25
FIGURA 1	Copo coletor com as amostras em tubos cônico com o termômetro acopla.....	26
FIGURA 2	Copo coletor com as amostras em tubos cônico dentro do isolante térmico e com o termômetro acoplado.....	26
FIGURA 3	Latas e isolante térmico do Sistema Equitainer®.....	26
FIGURA 4	Sistema Equitainer® durante a refrigeração.....	26

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS…… v

LISTA DE FIGURAS…… x

RESUMO…… 1

ABSTRACT…… 2

1. INTRODUÇÃO…… 3

2. REVISÃO DE LITERATURA…… 4

2.1 - Sêmen caprino…… 4

2.2 - Refrigeração de sêmen…… 6

2.2.1 - Alterações do sêmen durante a curva de refrigeração.. 7

2.2.2 - Equitainer®…… 9

2.3 - Meios diluidores…… 10

2.3.1 - Leite desnatado…… 11

2.3.2 - Gema de ovo…… 12

2.4 - Metabolitos Reativos do Oxigênio - ROS…… 13

2.5 - Mecanismo de ação dos antioxidantes…… 15

2.5.1 - Trolox®…… 16

2.5.2 - Catalase…… 17

3. HIPÓTESE…… 19

4. OBJETIVOS…… 19

5. MATERIAL E METÓDOS…… 20

5.1 - Local do experimento e animais experimentais..... 20

5.2– Coleta e avaliação do sêmen…….....……. 20

5.2.1. Análise de integridade das membranas espermáticas…. 22

5.2.2. Análise da morfologia espermática..... 23

5.3. Processamento do sêmen……..... 23

5.4. Padronização do Sistema Equitainer®..... 24

5.5 - Análise do sêmen pós-refrigeração ……...……..……. 27

5.5.1. Teste de exaustão 27

5.6 - Análise estatística …….....…….……..... 28

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO…….……. 29

6.1. Sêmen coletado e pré-refrigerado..... 29

6.2. Refrigeração por 24 horas ou 48 horas..... 31

6.3. Teste de exaustão após 24 horas de refrigeração..... 41

6.4. Teste de exaustão após 48 horas de refrigeração..... 47

7. CONCLUSÃO…….……... 52

8. REFERÊNCIAS .....……...……. 54

9. TRABALHO CIENTÍFICO…….……... 66

10. ANEXO I

10.1. Meios para refrigeração de sêmen..... 85

10.1.1.Glicina-Gema-Leite 5% - GGL..... 85

10.1.2.Glicose-Leite -GL..... 86

10.2. Antioxidantes - Trolox® e Catalase..... 87

10.3. Solução de Xcell®..... 88

10.4. Solução de Gluteraldeído a 0,2%..... 89

10.5. Sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio..... 90

10.6. Hamilton Thorne Setup for IVOS-12.3..... 91

RESUMO

SAKASHITA, S.M. Efeito da adição de Trolox® e Catalase ao meio Glicina-Gema-Leite sobre o sêmen caprino refrigerado por 24 ou 48 horas em sistema de Equitainer®. 2011. p.91. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

Objetivou-se determinar *in vitro* o efeito da adição de antioxidantes Trolox® e Catalase ao diluidor Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, utilizado na refrigeração do sêmen caprino em sistema de Equitainer® por 24 ou 48 horas, avaliando-se a motilidade espermática determinada no sistema computadorizado (CASA), a integridade de membrana plasmática pela combinação dos corantes fluorescente iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína (IP+DIC), patologia espermática em câmara úmida em solução de gluteraldeído e após a refrigeração ao teste de exaustão em banho-maria (37ºC até 240 minutos). Para isso foi utilizado o sêmen em duplicata (12 amostras) de 6 caprinos Boer, coletados com vagina artificial e diluído na concentração final de $400x10^6$ espermatozóides/mL em meio Glicose-Leite (GL) e nos diluidores Glicina-Gema-Leite com (GGL_{tc}) e sem (GGL) antioxidantes Trolox® e Catalase. As análises foram realizadas no sêmen fresco, após diluição (pré-refrigeração), 24 e 48 horas pós-refrigeração no sistema Equitainer®, e durante o teste de exaustão nos tempos 30, 60, 120 e 240 minutos de incubação em banho-maria. Foi demonstrado que o diluidor GGL_{tc} demonstrou melhor eficiência na proteção de acrossomo entre os diluidores. A adição de antioxidante ao diluidor GGL com 5% de gema de ovo foi capaz de manter baixo percentual de acrossomo lesado durante a refrigeração de até 48 horas e o sistema Equitainer® eficiente durante a refrigeração até 48 horas.

Palavras-chave: sêmen caprino, refrigeração, antioxidante.

ABSTRACT

SAKASHITA, S.M. The effect of adding Trolox® and Catalase in Glycine-Yolk-Milk extender on goat semen, cooled for 24 or 48 hours in Equitainer® system. 2011. p.91. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

The objetive was to determine *in vitro* the effect of adding antioxidant Trolox® and Catalase in the extender Glycine-Yolk-Milk with 5% of egg yolk, used in the goat semen cooling in Equitainer® system for 24 or 48 hours, evaluating sperm motility determined by the computerized semen analysis (CASA), the integrity of the plasma membrane by a combination of fluorescent carboxyfluorescein diacetato(DIC) and propidium iodide(IP), sperm pathology in the humid chamber in gluteraldehyde solution and after cooling to the exhaustion test in a water bath (37°C up to 240 minutes). For the semen that was used in duplicate (12 samples) for six Boer goats, collected with artificial vagina and diluted at a final concentration of $400x10^6$ sperm/mL using extenders Glucose-Milk (GL) and Glycine-Yolk-Milk (GGL_{tc}) and without (GGL) antioxidant Trolox® and Catalase. Analyses were performed in fresh semen, after diluition (pre-cooling) and 24 or 48 hours post cooling in Equitainer® system, and during the exhaustion test incubation in a water bath for 30, 60, 120 and 240 minutes. It has been shown that the extender GGL_{tc} showed better efficiency in protection acrossome between the extenders. The addition of antioxidant in the GGL with 5% egg yolk (GGL_{tc}) was able to maintain a low percentage of damaged acrossome during cooling up to 48 hours and the Equitainer® system during the cooling efficiency up to 48 hours.

Keywords: goat semen, cooling, antioxidant

1. INTRODUÇÃO

Como agronegócio, a caprinocultura apresentou acentuado crescimento nos últimos anos no Brasil, particularmente no Estado de São Paulo e Paraná, seja pelo aumento no efetivo dos rebanhos, seja pelo aumento no número de propriedades envolvidas nessa atividade e suas especializações, verificando-se ainda expressivo crescimento da demanda de carne, pele, e notadamente, matrizes e reprodutores com elevado valor de comercialização.

Das diversas biotecnologias disponíveis para a intensificação do manejo reprodutivo, preconiza-se a programação reprodutiva e distribuição dos cios e partos ao longo do ano, alicerçadas pelo uso racional da Inseminação Artificial (IA).

A IA possibilita a utilização de indivíduos geneticamente superiores com menores custos por serviço. Além disso, elimina a necessidade de transporte dos animais, os custos e inconvenientes da manutenção de um grande número de machos reprodutores na propriedade, possibilitando ainda a realização de programas de melhoramento genético, de cruzamentos industriais e controle de determinadas enfermidades.

A IA com sêmen refrigerado em caprinos apresenta resultados práticos mais viáveis, tanto do ponto de vista econômico quanto produtivo, com índices reprodutivos mais próximos daquele obtido em monta natural ou sêmen fresco, e superiores daqueles obtidos com sêmen congelado.

Entretanto, o êxito desta biotecnologia depende em grande parte do desenvolvimento de diluentes satisfatórios, cujo emprego visa aumentar o volume do ejaculado, proteger os espermatozóides durante o resfriamento prolongando sua sobrevivência, além de apresentar efeitos benéficos sobre a fertilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sêmen caprino

O sêmen caprino apresenta particularidades que o diferencia do sêmen de outras espécies. A mais importante é a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbo uretrais, liberadas no plasma seminal (SIMPLÍCIO & MACHADO, 1989).

O plasma seminal dos caprinos é rico em fosfolipase A, que ao interagir com os fosfolipídios da maioria dos diluidores, catalisa a hidrólise de lecitina presente na gema de ovo e liberam ácidos graxos e lisolecitinas, responsáveis pela ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática que são altamente tóxicos para os espermatozóides (ROY, 1957, IRITANI & NISHIKAWA, 1961; AMMDAL et al., 1965, CORTEEL, 1974). A reação de hidrólise promove uma atividade fusogênica na membrana dos espermatozóides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina (ROY, 1957; GIBBONS, 2002; apud CASTELO et al., 2008).

Em função dos efeitos deletérios, a composição enzimática do sêmen do bode e os diluidores assumem grande importância no processo de conservação do sêmen congelado ou refrigerado (SIMPLÍCIO & MACHADO, 1989).

No congelamento quando se utiliza sêmen caprino total, ocorre à redução do número de espermatozóides vivos sendo diretamente proporcional ao tempo de armazenamento e a remoção do plasma seminal pela centrifugação imediatamente após a coleta do sêmen, antes do congelamento, mostrou ser benéfica à sobrevivência das células espermáticas pós-descongelação em vários trabalhos (CORTEEL 1974; RITAR & SALAMON, 1982; TULI & HOLTZ, 1994; MACHADO & SIMPLÍCIO, 1995; LEBOUEF, 2000).

Para Corteel (1977); Ritar e Salamon (1982); Tuli e Holtz (1994); na espécie caprina, quando ocorreu a remoção do plasma seminal no processo de

centrifugação, contribuindo na percentagem de células vivas e motilidade durante o congelamento, em diluentes de gema de ovo ou leite.

Dunner et al., (1993) observaram que amostras de sêmen total e com remoção do plasma seminal, quando apenas refrigeradas, não apresentaram diferenças significativas quanto à motilidade espermática progressiva. Porém, Salvador et al., (2007), obtiveram melhor viabilidade do sêmen refrigerado por longa duração, quando utilizaram meio a base de leite e remoção de plasma seminal. Roca et al., (1997), não obtiveram nenhuma melhora na remoção do plasma seminal na viabilidade *in vitro* ou na fertilidade *in vivo* em sêmen diluído em TRIS, submetido à refrigeração.

Ritar e Salamon (1982) recomendaram o uso de 1,5% de gema de ovo, sem remoção do plasma seminal, como uma alternativa prática em sêmen congelado.

Nunes (1982), citado por LEBOEUF et al., (2000), acrescentou que os produtos oriundos das glândulas bulbo-uretrais possuem componentes importantes na preservação dos espermatozóides de bode.

Chauhan e Anand (1990), em estudo da atividade das enzimas fosfolipase e lisofosfolipase sobre as lecitinas contidas na gema de ovo utilizada no diluente à base de Tris, concluíram que não há hidrólise desses fosfolipídeos. Observaram ainda que o congelamento do sêmen em diluente de Tris-gema de ovo, sem a remoção do plasma seminal, produz altas taxas de fertilidade.

Outros autores, (BISPO, 2005; VIANA et al., 2006; PALOMINO et al., 2007), quando avaliaram a eficácia da diluição em glicose-leite e Tris-gema de ovo, sem centrifugação do plasma seminal submetido à refrigeração observaram que a presença do plasma seminal não influenciou as características do sêmen pós-refrigeração.

Porém Azerêdo et al., (2001), utilizando o diluente com 2,6% de gema de ovo, concluíram que a remoção de plasma seminal foi prejudicial ao sêmen fresco e ao submetido à congelação, uma vez que o percentual de

espermatozóides com membranas plasmáticas integra e com motilidade espermática diminuíram após a centrifugação do plasma seminal.

2.2. Refrigeração de sêmen

Na conservação das células espermáticas de caprinos são utilizadas duas técnicas básicas: a congelação e a refrigeração (NUNES, 2001). Na primeira técnica mantém-se o sêmen à temperatura do nitrogênio liquido (-196ºC), por tempo indeterminado, intensificando o uso dos reprodutores.

Na segunda técnica o sêmen caprino é conservado sob refrigeração em temperaturas entre 15ºC a 2ºC, porém, as temperaturas mais utilizadas são entre 5ºC e 4ºC (ROCA et al. 1997), pois, nos espermatozóides armazenados a 5ºC, as necessidades metabólicas decrescem a aproximadamente 10% daquela que teriam se estivessem à temperatura de 37ºC (LEBOUEF et al. 2000).

Segundo Evans & Maxwell (1987), o período máximo de conservação do sêmen a 5ºC para obtenção de um grau aceitável de fertilidade através da inseminação artificial é de 24 horas para ovinos e de 48 horas para caprinos.

Segundo Medeiros et al. (1994) e Gonsalves et al. (2001) o sêmen caprino conservado sob refrigeração a 4ºC pode ser utilizado em um curto espaço de tempo, tendo uma viabilidade máxima de 48 horas.

No entanto Shamsuddin et al. (2000) e Palomino et al. (2007) concluíram que a viabilidade do sêmen refrigerado a 5ºC pode chegar até 96 horas e que a motilidade do sêmen se manteve acima de 50% pós refrigeração dependendo do diluente.

Após a diluição do sêmen caprino, o ritmo de queda de temperatura deve ser compreendido entre 0,25ºC/min. a 0,35ºC/min. até atingir a temperatura de 5ºC, mantendo a motilidade dos espermatozóides em baixos níveis por alguns dias (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995).

Douglas & Hamilton et al. (1984), comparando taxas de resfriamento rápido (maiores que 1ºC/min.), médio (entre 1ºC/min. e 0,33ºC/min.) e lento (menores que 0,33º C/min.), concluíram que as taxas lenta e rápida causam maiores danos a célula espermática (maior número de patologias, menor motilidade e maior número de células mortas após resfriação) que a taxa média.

2.2.1. Alterações do sêmen durante as curvas de refrigeração

A membrana celular é composta por proteínas e lipídios. Os lipídios estão organizados de forma bilaminar, onde a porção hidrofílica está direcionada para o exterior e a hidrofóbica está voltada para a face interna da membrana. Essa disposição confere à célula uma barreira hidrofóbica, pela qual a água e as moléculas nela dissolvidas são impedidas de transpor a membrana plasmática. As proteínas permitem a formação de canais hidrofílicos intercalados à barreira hidrofóbica, pois são nesses locais que a água e as moléculas que nela estão dissolvidas conseguem transpor a membrana e, assim, proporcionar trocas entre os meios interno e externo da célula (AMANN & GRAHAM, 1993).

O conhecimento obtido sobre as membranas plasmáticas está baseado no modelo do mosaico fluído proposto por Singer e Nicholson (1972), no qual os lipídios estão livres, com movimento lateral, proporcionando fluidez à membrana.

Em temperaturas de 37ºC, os lipídios encontram-se em estado fluído e dispostos de forma aleatória. Quando há diminuição da temperatura do meio em que essas células estão contidas, ocorre um alongamento das cadeias de ácidos graxos, resultando no aumento da sua rigidez. Ocorre então que os fosfolipídios semelhantes tendem a se agrupar, dando origem a estruturas cristalinas de forma hexagonal, e somente uma porção pequena destes fosfolipídios mantém-se na forma líquida. Esse arranjo irá favorecer o deslocamento das proteínas para esses locais, as quais se fundem e, conseqüentemente, formam agregados protéicos que resultam em aumento da

permeabilidade da membrana e na diminuição do metabolismo celular (AMANN & PICKETT, 1987; STRYER, 1988; AMANN & GRAHAM, 1993).

Os danos sofridos pelas células espermáticas são irreversíveis, sendo caracterizados por movimento anormal, ou seja, ocorre comprometimento do padrão de motilidade progressiva, assim como sua perda, danos ao acrossomo e à membrana plasmática; aumento da permeabilidade celular; redução do metabolismo; e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

Os danos aos espermatozóides podem ser classificados de duas formas: a injúrias diretas do resfriamento e as injúrias indiretas ou latentes (VERNER et al.1988).

As injúrias diretas resultam em alterações da membrana plasmática e subseqüentes danos bioquímicos e metabólicos, que são imediatamente evidenciados pelas alterações de motilidade do espermatozóide ou por meio de testes bioquímicos. Os danos latentes são aqueles detectados somente horas ou dias após as células serem submetidas ao processo de refrigeração e armazenamento entre 0ºC e 5ºC (VERNER et al., 1988).

Nas células espermáticas de eqüinos os danos causados pelo choque térmico podem ser minimizados quando submetidas a taxas de refrigeração lenta, na faixa de temperatura entre 20ºC e 4ºC (PICKET & AMANN, 1993).

Moran et al. (1992), estudando as faixas de temperatura que induzem choque térmico em espermatozóides eqüinos, concluíram que as temperaturas entre 19ºC e 8ºC são as que tornam as células mais suscetíveis aos danos celulares e quando utilizada a taxa de refrigeração rápida (-0,7ºC/minuto) de 37ºC a 19ºC não ocorre choque térmico.

Kayser et al. (1992) avaliaram curvas de resfriamento com a intenção de minimizar os danos às células espermáticas de eqüinos e concluíram que os espermatozóides dessa espécie podem ser rapidamente resfriados dos 37ºC aos 20ºC, mas recomendam que dos 20ºC aos 5ºC que seja utilizado a taxa de refrigeração lenta, com queda de temperatura não superior a - 0,1ºC/minuto e preferencialmente a - 0,05ºC/minuto, onde a manutenção da sobrevivência espermática a 5ºC é maximizada.

Fürst (2002) obteve êxito na refrigeração de sêmen eqüino na faixa de 18ºC a 8ºC, utilizando taxas de refrigeração com temperatura média de - 0,5ºC/minuto e - 0,3ºC/minuto, onde os danos à membrana espermática foram reduzidos, o que foi constatado pelo teste hiposmótico e pela coloração supravital (eosina-nigrosina).

Douglas & Hamilton et al. (1984) estudaram, para sêmen de eqüinos, as taxas de refrigeração rápida (acima de - 1°C/minuto), média (entre - 1ºC/minuto e - 0,33ºC/minuto) e lenta (menores que - 0,33ºC/minuto), e concluíram que as taxas lenta e rápida causam maiores danos, ou seja, maior número de patologias, menor motilidade e maior número de células mortas após o resfriamento.

Machado e Simplício (1995) relataram que para o sêmen caprino o ritmo de refrigeração deve estar entre - 0,25ºC/min e - 0,35ºC/minuto, até que seja atingida a temperatura de 5ºC.

Bispo (2005) relatou que no sêmen caprino a utilização de diluentes a base de gema de ovo foram mais eficazes durante as curvas de refrigeração de - 0,33ºC e - 0,5ºC até 5º C por 24 e 48 horas e na utilização de diluentes a base de leite desnatado somente nas curvas de refrigeração de - 0,5ºC.

2.2.2. Equitainer®

Visando o armazenamento e transporte do sêmen em condições adequadas para permanecer com a viabilidade fertilizante, o sistema utilizado Equitainer® foi o primeiro sistema de transporte de sêmen desenvolvido comercialmente (SOUSA, 2002).

Tratando-se de um produto durável e reutilizável, sua desvantagem consiste no alto custo de aquisição e necessidade de trocas anuais de componentes. Porém é um sistema estável independente da temperatura ambiente que seja submetido, não alterando as curvas de refrigeração (KATILA, 1997; BRINSKO et al., 2000 apud SOUSA, 2002).

O sistema Equitainer® possui uma taxa de refrigeração inicial de aproximadamente - 0,3ºC por minuto (KATILA, 1997 apud SOUSA, 2002).

Contudo, por ser um sistema passivo de refrigeração, fornece taxas variáveis de refrigeração, que se reduzem com a diminuição da temperatura interna do sistema (BRINSKO et al., 2000).

Katila (1997) relatou que o Equitainer® é capaz de manter sua temperatura interna de aproximadamente 5ºC durante até 48 horas, por isto sendo recomendado para períodos de transporte superiores a 24 horas.

Sousa (2002), avaliando o sistema de geladeira e do Equitainer®, comprovou que a utilização do sistema Equitainer® para refrigeração do sêmen ovino a 5ºC é viável, por ser um sistema passivo de refrigeração, não sofrendo influencia das oscilações da rede elétrica, da temperatura ambiente, além de apresentar praticidade ao transporte.

2.3. Meios diluidores

Os diluidores além de aumentarem o volume seminal, permitindo seu fracionamento, exercem papel fundamental na preservação do sêmen, tanto no processo de refrigeração quanto no de congelação (SALAMON & MAXWELL, 2000).

É muito importante a escolha de um bom diluente, onde este deve ser atóxico para os espermatozóides, ser de baixo custo, preparo fácil e ter pH e pressão osmótica compatíveis com a sobrevivência espermática, inibir o crescimento bacteriano sendo fundamental na conservação, pois deverá conter substâncias que ao mesmo tempo proporcionem aporte nutricional e proteção às células contra o choque térmico que ocorrem durante as curvas de refrigeração.

Os diluidores para conservação espermática devem possuir uma substância orgânica que atue como crioprotetor externo, como a gema de ovo ou leite desnatado já que a fosfatidilcolina (lecitina) e as lipoproteínas da gema e a caseína do leite protegem os espermatozóides durante a refrigeração,

contra o choque térmico que se produz ao refrigerar o sêmen desde os 20°C aos 5°C (MIES FILHO et al., 1982; DAS & RAJKONWAR, 1995); uma fonte de energia, como a glicose ou frutose; um componente tampão, como citrato de sódio ou hidroximetil aminometano (TRIS); um crioprotetor interno que proteja os espermatozóides durante o congelamento, a exemplo do glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol; e antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano, como penicilina, estreptomicina ou gentamicina (EVANS & MAXWELL, 1987).

Um relevante número de diluidores de sêmen caprino tem sido utilizado em testes de laboratórios e de fertilidade, tais como: salina, citrato de sódio-gema (Citrato-Gema), citrato de sódio-frutose-gema, sacarose-EDTA, bicarbonato de cálcio-gema, Tris-gema (LEBOEUF et al., 2000), água de coco (SIMPLICIO, 1987), leite em pó ou reconstituído, com ou sem gema de ovo.

E os mais utilizados para a conservação do sêmen na forma líquida (4ºC - 5°C) são: o leite em pó, os diluidores a base de citrato de sódio, Tris (LEBOUEF et al., 2000), gema de ovo (HERRERA e TAPIA, 1998; BISPO, 2005; VIANA et al., 2006; PALOMINO et al., 2007).

2.3.1. Leite desnatado

O leite desnatado é a base mais utilizada nos diluidores de sêmen caprino para uso na inseminação artificial. A capacidade de fertilização dos espermatozóides estocados em diluente de leite ou à base de leite é de aproximadamente 12 a 24 horas. O leite é um meio fisiológico, porém complexo, por isso este componente apresenta-se com muitas variações nos resultados obtidos, e seus mecanismos de ação para preservação celular não estão bem elucidados (BISPO, 2005; LEBOEUF et al., 2003).

No caso dos diluidores à base de leite, uma fração protéica, também oriunda da glândula bulbo uretral, denominada BUSgp60, hidrolisa os seus triglicerídeos, resultando na produção de ácidos graxos tóxicos aos espermatozóides de caprinos, como o ácido oléico, capazes de inibir sua motilidade (CORTEEL et al., 1984; LEBOEUF et al., 2000).

O efeito BUSgp60 pode ser direto sobre os fosfolipídeos da membrana dos espermatozóides ou indireto, pela produção de derivados tóxicos dos lipídeos do leite (CORTEEL et al., 1984; LEBOEUF et al., 2000).

Alguns autores como Shamsuddin et al., (2000) relataram que o sêmen caprino sem lavagem, diluído em leite desnatado é viável por apenas 48 horas, porém, Salvador et al., (2007), relataram que na refrigeração a 5ºC e o uso de diluidores a base de leite é um método viável para prolongar a viabilidade.

2.3.2. Gema de ovo

A uniformidade na preparação dos diluidores de sêmen contendo gema de ovo é difícil de ser atingida devido às suas características individuais, como idade do ovo, tipo de alimentação das aves, à variação na composição da gema de ovo, dependendo da linhagem da ave e a variação sazonal na concentração da enzima coaguladora da gema de ovo no plasma seminal (CORTEEL, 1973, ROCA et al., 1997).

Deve ser considerado, exclusivo do macho caprino, o fato das suas glândulas bulbo-uretrais produzirem, particularmente, uma fosfolipase (EYCE) que hidrolisa a lecitina da gema de ovo, formando ácidos graxos e lisolecitinas, esta última atuando sobre a membrana espermática danificando-a (ROY, 1957).

Essa lisolecitinas é tóxica devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática (NUNES, 1982).

A gema de ovo atua na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídeos e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolipídeos que compõe a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen, especificamente durante o processo de refrigeração a 5ºC.

As concentrações de gema de ovo rotineiramente utilizadas nos diluidores têm variado de 1,5% a 50% (WATSON, 2000; SALAMON &

MAXWELL, 2000) e sua redução é de grande interesse, uma vez que a combinação de gema de ovo e glicerol poderia promover uma estabilização ou desestabilização das membranas dependendo da concentração e do tempo de exposição dos espermatozóides frente a estes dois componentes (KATKOV et al., 1998), podendo gerar como conseqüência, uma maior produção de ROS (MORANI, 2004).

Segundo Rodello et al. (2011), a utilização de Glicina-Gema-Leite 5% (GGL5%) em sêmen ovino congelado, fornecem resultados superiores aos diluído em Glicina-Gema-Leite 20% (GGL20%).

Segundo Gil et al., (2003), com base em estudos de concentrações de 5, 10, 15 e 20% de gema de ovo em meio à base de leite, nenhum efeito benéfico foi obtido pela utilização de gema de ovo em quantidades acima de 10% em sêmen ovino refrigerado. Já Roca et al. (1997), observaram que os espermatozóides caprinos foram preservados a 5ºC, durante 6 a 36 horas, em diluidor contendo 2% de gema de ovo.

Ritar e Salamon (1982 e 1991) observaram que a concentração de 1,5% de gema de ovo não interferiu na viabilidade dos espermatozóides caprinos não lavados e coletados fora da estação reprodutiva.

2.4. Metabólitos reativos do oxigênio - ROS

Metabólitos reativos do oxigênio (ROS, do termo em inglês: *reactive oxygen species*), radicais livres e oxidantes são termos usados, para identificar os intermediários químicos reativos do metabolismo do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001; apud MAIA, 2006).

O termo radical livre não é considerado o mais adequado, pois nem todos os metabólitos reativos do oxigênio são radicais livres. O mesmo se aplica ao termo oxidante, uma vez que algumas ROS (ex. O_2^- e H_2O_2) podem atuar tanto como agentes oxidantes como redutores, em sistemas diferentes. Já o termo, metabólitos reativos do oxigênio (ROS) inclui todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os ROS são encontrados em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001 apud MAIA et al., 2009).

Durante esse processo são formados intermediários reativos como: os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^-) e hidroxila (OH^-) e, o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria e a reatividade dos ROS é neutralizada pela entrada de quatro elétrons (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O radical ânion superóxido (O_2^-) é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Sua formação ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Este é um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz OH^-; possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutationa peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O radical hidroxila (OH^-) é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS. É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (MAIA, 2006).

O radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, conhecida como lipoperoxidação. Induzem danos ao DNA, a rápida perda do potencial fertilizante dos espermatozóides e perda da adenosina trifosfato do axonema da cauda (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A geração de altas concentrações de ROS no sêmen está associada ao declínio no metabolismo de energia do espermatozóide, na motilidade e na viabilidade espermática e com a fragmentação do DNA em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens (ARMSTRONG et al., 1999; DURU et al., 2000, apud MAIA, 2006; KRZYZOSIAK et al., 2000; BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002).

Uma das principais causas da deterioração espermática é o estresse oxidativo (BATELLIER et al*.,* 2001). De fato, as células espermáticas são caracterizadas por sua capacidade incomum de gerar metabólitos oxigênio-reativo (ROS), que causam peroxidação lipídica, especialmente durante a sobrevivência espermática (SALAMON & MAXWELL, 2000; BATELLIER et al*.,* 2001).

2.5. Mecanismo de ação dos antioxidantes

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas aquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente, a oxidação daquele substrato. A adição de antioxidantes ao diluente tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozóide do efeito tóxico dos ROS, (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; apud MAIA 2006).

Os níveis de antioxidantes presentes normalmente no sêmen ainda são parcialmente removidos com a diluição do sêmen o que pode reduzir consideravelmente o efeito benéfico do antioxidante natural, assim, a adição destes agentes, mesmo em pequenas concentrações, pode melhorar a função espermática do sêmen manipulado (MAIA, 2006).

Para proteger do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático (NORDBERG & ARNER, 2001).

Enzimático: neutralizam o excesso da formação das ROS e previnem os danos a estruturas celulares. São compostos pelas enzimas: Superoxido dismutase (SOD); Catalase (CAT), peroxiredoxinas (Prx), Glutationa (GSH), glutationa redutase (GR), e glutationa peroxidase (GPx) (NORDBERG & ARNER, 2001).

Não enzimático: compostos de baixo peso molecular, incluindo as vitaminas C e E, diferentes compostos de Selênio, ubiquinonas (coenzima Q), Ácido Úrico e Ácido lipoíco (NORDBERG & ARNER, 2001).

Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente antes que ele cause lesão (glutationa reduzida, superoxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase e vitamina E) ou como reparador da lesão ocorrida (ácido ascórbico, GR e GPx) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontram-se no meio intracelular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

2.5.1. Trolox®

O 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, nomeado de Trolox®, é um análogo hidrossolúvel do tocoferol que foi sintetizada por Scott e sua equipe em 1974. Esta substância apresenta propriedades antioxidante maiores que a das (Vitamina E) α e γ-tocoferol, tanto em gordura animal quanto vegetal (CORT et al., 1975).

O mecanismo de ação do efeito antioxidante do Trolox® é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve o OH^- fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI & ABUJA, 1999). Sua estrutura é composta por um núcleo “croman”, semelhante ao do α- tocoferol, e um grupo ácido carboxílico no carbono 2 (REZK et al., 2004).

A maioria das ROS, por exemplo, o ânion superóxido é gerado em fase aquosa, assim o Trolox® apresenta vantagem sobre os outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como a vitamina E. (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001; apud MAIA et al.,2009).

Devido a sua estrutura cromonal, que lhe dá atividade antioxidante e ao grupo carboxila, que tem moderado efeito hidrossolúvel, o Trolox® é distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação (BARCLAY et al., 1995 apud MAIA, 2006).

Além disso, o Trolox® pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica (membrana intacta) sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração (BARCLAY et al., 1995 apud MAIA, 2006).

2.5.2. Catalase

A catalase é uma heme-proteína citoplasmática, e se localiza nos peroxissomos das células de mamíferos, atuando como antioxidante enzimático e catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). Também atua na destoxificação de diferentes substratos (ex. fenóis e alcoóis), via redução do peróxido de hidrogênio (MAIA, 2006).

A função da catalase como antioxidante é diminuir o risco de formação do radical hidroxila (OH^-) a partir do H_2O_2 via reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997) e também tem um papel importante no controle do estresse oxidativo da célula espermática, possivelmente resultante da presença da H_2O_2 (BUCAK et al, 2007).

A catalase atua apenas nas porções aquosas das células, portanto partes lipídicas como a membrana celular permanecem desprotegidas e susceptíveis a ação de peróxidos de hidrogênio (FERREIRA & MATSUBARA, 2006). E também exerce a função de remoção do O_2^- gerado pela NAPDH

oxidase dos neutrófilos e desempenham papel importante na diminuição da lipoperoxidação (LPO) e protegem os espermatozóides dos danos oxidativo (SIKKA, 1996).

3 - HIPÓTESES

3.1. O sistema Equitainer® de refrigeração é eficiente na manutenção da viabilidade do sêmen caprino por 48 horas.

3.2. A adição de Trolox® e Catalase ao meio Glicina-Gema-Leite implica na melhoria qualitativa do sêmen caprino submetido ao processo de refrigeração.

4 - OBJETIVOS

4.1. Avaliar a eficiência de sistema Equitainer® de refrigeração na preservação à 5ºC dos parâmetros espermáticos de cinética e morfologia do sêmen caprino por 24 ou 48 horas.

4.2. Avaliar comparativamente os efeitos do emprego dos diluidores Glicose-Leite, que pelo uso consagrado em sêmen caprino servirá como controle e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado ou não com Trolox® e Catalase, sobre os parâmetros espermáticos de cinética e morfologia do sêmen caprino após refrigeração à 5ºC por 24 ou 48 horas e durante o teste de exaustão, na incubação à 37ºC por 240 minutos.

5.- MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local do experimento e animais experimentais

Os procedimentos foram realizados na Universidade Estadual Paulista (UNESP) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) situado no município de Botucatu, Estado de São Paulo (latitude 22º 53'S, longitude 48º 29' W) nas instalações do Departamento de Radiologia e Reprodução Animal: no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN),

Foram utilizados, 6 caprinos, machos da raça Boer pertencentes a propriedades da região de Botucatu e Itapetininga - SP e da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento - UPD/APTA - Pólo de Itapetininga, SP, com idade entre 1 a 4 anos, com pesos entre 45 a 90 kg e constada a aptidão reprodutiva pelo exame clínico-andrológico conforme o Manual do CBRA (1998).

Os reprodutores foram mantidos em baias individuais nas dependências do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos. Durante todo o período experimental, compreendido de agosto a dezembro de 2010, os bodes receberam alimentação a base de feno de "coast-cross", concentrado para a manutenção de reprodutores caprinos com 16% de proteína bruta (PB) e 85% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e livre acesso à água e sal mineral.

5.2. Coleta e avaliação do sêmen

Cada reprodutor (n=6) foram coletados e processados 2 ejaculados a cada 2 dias, totalizando 12 coletas.

O sêmen foi obtido pelo método de vagina artificial a temperatura de 42°C, com copo coletor graduado pré-aquecido à 37°C, tendo como manequim uma fêmea caprina, contida e com o comportamento de receptividade ao macho induzida pela aplicação de 2mg de cipionato de estradiol[1] por via intramuscular a cada sete dias, durante todo o período de coleta.

Após cada coleta o sêmen foi mantido em banho-maria a 32°C e avaliado visualmente quanto ao aspecto e o volume através da graduação do copo coletor. Dez microlitros (µL) de sêmen foram diluídos em quatro mililitros (mL) de água destilada com taxa de diluição 1:400, para a determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer (CBRA, 1998).

Em seguida, 4 µL sêmen a fresco foram diluídos em 500 µL de X-Cell®[2] (AZEVEDO, 2006) mantendo uma concentração final de aproximadamente $48x10^6$ espermatozóides/mL (DAVIS et al., 1992). Em seguida 6 µL do sêmen diluído foram transferidos para câmara de Makler[3] pré-aquecida a 37ºC e submetida à análise computadorizada da cinética espermática[4] (CASA), onde foram avaliados em três campos selecionados aleatoriamente, os seguintes parâmetros:

- **MT** - Motilidade total (%)
- **MP** - Motilidade progressiva (%);
- **VAP** - Velocidade de trajeto (µm/s);
- **VSL** - Velocidade progressiva (µm/s);
- **VCL** - Velocidade curvilinear (µm/s);
- **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (µm);
- **BCF** - Freqüência de batimentos do flagelo (Hz);
- **STR** - Retilinearidade (%);
- **LIN** - Linearidade (%).

---

[1] ECP® - Cipionato de estradiol – Tuco/Pfizer do Brasil
[2] X-Cell® – IMV, France
[3] Makler Counting Chamber – Sefi-Medical, Haifa, Israel
[4] Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA – IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA

5.2.1. Análise de integridade das membranas espermáticas

Para a análise da integridade total das membranas espermáticas, foram coletadas alíquotas do sêmen *in natura*, pré e pós-refrigeração por 24 ou 48 horas e durante o período do teste de exaustão.

Foi preparada uma solução de trabalho, adicionando a cada mililitro (mL) de solução salina, 20 µL de formaldeído, 20 µL de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e 10 µL de iodeto de propídio (IP) (Anexo I, HARRISON & VICKERS, 1990).

Para realizar a análise, 50 µL da solução de trabalho foi depositado em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf®), em seguida, acrescida 10 µL de sêmen, mantendo uma concentração final de 10^7 espermatozóides/mL.

Após incubação de no mínimo 8 minutos à temperatura ambiente, 5 µL dessa suspensão foi depositado entre lâmina e lamínula e observado em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência[5] com filtro de excitação (BP) 450-490nm, espelho dicromático 510nm e filtro de supressão (LP) 515nm (HARRISON & VICKERS, 1990) onde 100 espermatozóides/lâmina foram avaliados e distribuídos percentualmente (%) nas seguintes classificações:

Íntegros:

- acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha);

Lesados:

- acúmulo de IP ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de DIC.
- acúmulo de DIC na peça intermediária e acúmulo de IP na cabeça unicamente e acúmulo de fluorescência amarelada na região acrossomal;
- acúmulo de IP na cabeça e de DIC na peça intermediária.

[5] Leica DM LB, Germany

5.2.2. Análise da morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática, foram coletados alíquotas do sêmen *in natura*, pós-refrigeração de 24 ou 48 horas e durante o teste de exaustão.

Cada alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em 500 µL de solução de gluteraldeído a 0,2% (Anexo I, BARTH & OKO, 1989). As amostras foram acondicionadas em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL e estocadas à temperatura entre 4º a 5ºC para posterior leitura.

Para a leitura, foi utilizada a microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x sob imersão através de preparações úmidas, colocando uma gota entre lâmina e lamínula e classificando 100 células por preparação, de acordo com Blom (1973).

Nas análises dos dados, foram levados em consideração os espermatozóides com acrossomo lesado (**%**) e aqueles com cauda dobrada (**%**).

5.3. Processamento do sêmen

Após as avaliações do ejaculado, o sêmen foi destinado a três tratamentos de acordo com o meio em que foi diluído:

- **GL** – Glicose-Leite (CORTEEL, 1973, apud SOUSA, 2002).
- **GGL** – Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (Osmolaridade: 288 mOsm e pH: 7,2) - (GONZALEZ, 1996 modificado por RODELLO, et al., 2011).
- **GGL_{tc}** – Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (Osmolaridade: 288 mOsm e pH: 7,20 + Trolox® 50 µMol /100x10^6 espermatozóides + Catalase 50 µg/mL. 0,0935 U/mL; MAIA et al., 2009).
-

Com a finalidade de realizar a refrigeração em sistema Equitainer® por 24 horas ou 48 horas, para cada tratamento foram utilizados 2 microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL, totalizando 6 alíquotas com $100X10^6$ espermatozóides totais em cada microtubo de fundo cônico.

As diluições foram realizadas à 32ºC em primeiro lugar para a fração controle (GL), em seguida para a fração GGL sem antioxidante e logo após para a fração GGL com adição de antioxidante.

5.4. Padronização do Sistema Equitainer®

Para o estudo, foi necessária a realização de pré-ensaios para a padronização dos 2 sistemas Equitainer®, que foram sofrendo algumas modificações, a fim de manter o controle da curva de refrigeração e a temperatura estável em 5ºC por até 48 horas.

Assim foram realizadas calibrações dos equipamentos com o acréscimo de um lastro térmico que serviu de suporte para microtubos de fundo cônico na posição vertical, que consistiu na utilização de um copo coletor (100 mL) com água pré-aquecida à 32ºC, tendo em sua tampa 7 orifícios que permitissem o acondicionamento dos microtubos contendo as amostras.

As médias de temperatura ambiente e interna do sistema Equitainer® - 1 e 2 obtidos em 4 testes realizados após a padronização da temperatura foram registradas no Gráfico1.

Para acondicionar as amostras do estudo, a cada ciclo de refrigeração, procedeu-se o encaixe no interior dos dispositivos de 2 latas Equitainer® (Figura 3) previamente mantidas em congelador à 20ºC negativos por no mínimo 24 horas, e sobre as latas foram acondicionados o isolante térmico (Figura 3) e suporte para microtubos na posição vertical (Figura 1 e 2), previamente aquecido a 32ºC e para a monitoração da temperatura foi acoplado um termômetro, com registro de temperaturas (máxima e mínima) interna do sistema e do ambiente. O sistema contendo as alíquotas permanecia hermeticamente fechado por todo tempo de refrigeração (Figura 4).

Os microtubos de fundo cônico de polipropileno foram colocados no Sistema Equitainer® de refrigeração, composto pela unidade de armazenamento, latas de refrigeração e isolante térmico, com característica de queda de temperatura na razão de 0,33ºC/minuto.

No experimento foram utilizados 2 dispositivos Equitainer®, um para análise das 24 horas e outro para 48 horas de refrigeração.

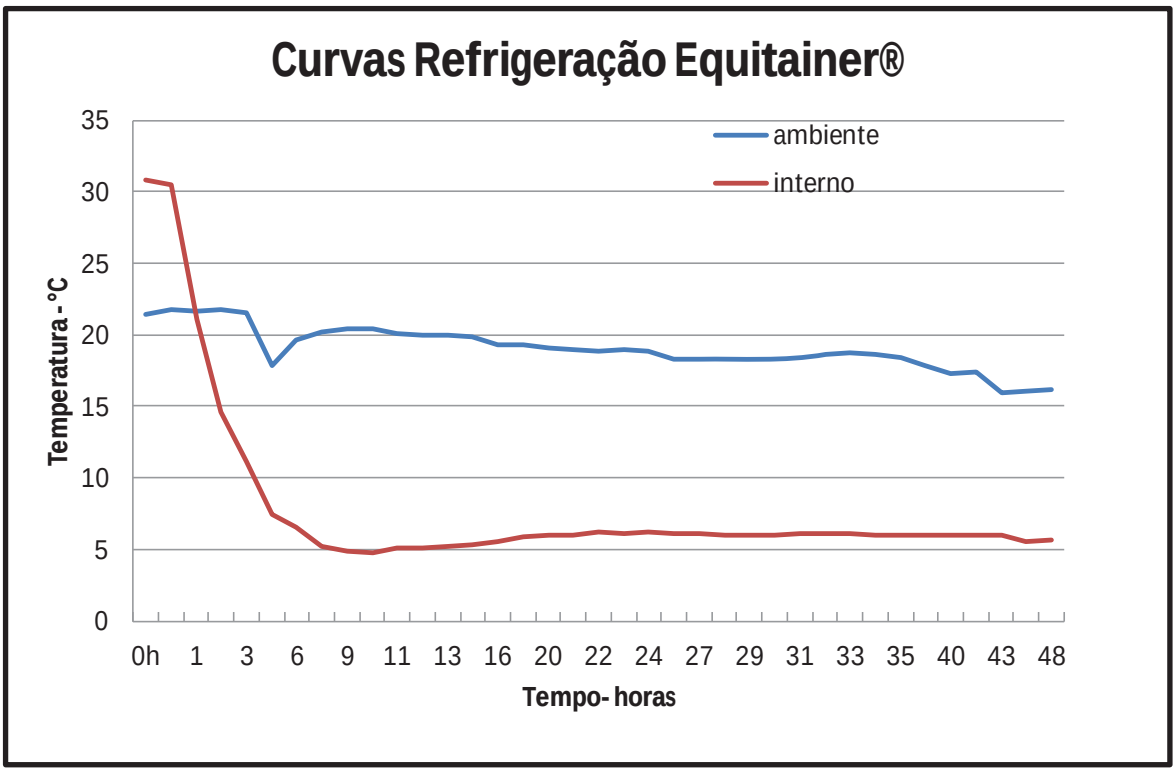

Gráfico 1:Médias das Curvas de Refrigeração do Sistema Equitainer® 1 e 2 , e curvas de temperatura ambiente após modificações.

Figura 1: Copo coletor com as amostras em tubos cônico com o termômetro acoplado.

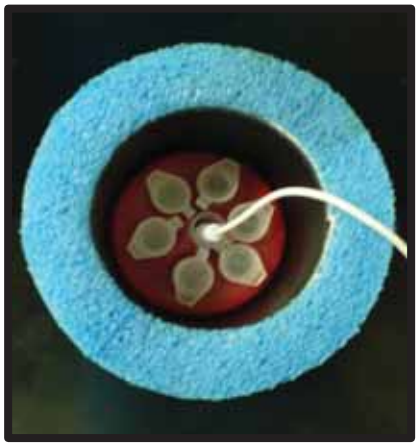

Figura 2: Copo coletor com as amostras em tubos cônico dentro do isolante térmico e com o termômetro acoplado.

Figura 3: latas e isolante térmico do Sistema Equitainer®

Figura 4: Sistema Equitainer® durante a refrigeração.

5.5. Análise do sêmen pós-refrigeração

Ao término de 24 ou 48 horas o sistema Equitainer® foi aberto, os microtubos de fundo cônico contendo as alíquotas foram retirados e acondicionados no banho-maria a temperatura de 37ºC durante 5 minutos, e em após homogenização iniciava-se as análises pós-refrigeração:

- Análise computadorizada da cinética espermática (24 µL de amostra)
- Análise de Integridade total das membranas espermáticas (10 µL de amostra)
- Análise de morfologia espermática – acrossomo lesado e cauda dobrada (30µL de amostra)

Utilizando-se para análise computadorizada da cinética espermática 200µL de solução de X-Cell® em 24 µL de amostra, para análise de integridade total das membranas espermáticas 50µL de solução de trabalho em 10µL de amostra e para a análise de morfologia espermática utilizaram 300µL de solução de Gluteraldeído 0,2% para 30µL de amostra.

5.5.1. Teste de exaustão

Ao término da análise pós-refrigeração, cada alíquota recebeu uma fração de 65µL (total retirado para as análises) do diluidor correspondente, à temperatura de 37ºC (SOUSA, 2002), e foram submetidas ao teste de exaustão pela incubação das amostras à 37°C durante 240 minutos (PAGANINI FILHO, 1999). Foram repetidas as análises computadorizada da cinética espermática (24µL de amostra), de Integridade total das membranas espermáticas (10µL de amostra) e da morfologia espermática – acrossomo lesado e cauda dobrada (30µL de amostra) nos tempos de 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 240 minutos de incubação.

Após cada análise, seguiu-se a adição de 65 µL do diluidor correspondente, previamente aquecido à 37ºC, em cada uma das alíquotas (SOUSA, 2002).

5.6. Análise estatística

Como havia interesse em se comparar os tratamentos, os tempos de refrigeração e os momentos de incubação (teste de exaustão), os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com três tratamentos (GL, GGL e GGL_{tc}), dois tempos de refrigeração (24 e 48 horas) e cinco momentos de incubação (0, 30, 60, 120 e 240 minutos). Para a análise dos dados utilizaram-se às médias dos valores obtidos das duas coletas de cada animal. Foram ainda avaliados os efeitos dos animais sobre os parâmetros estudados. Como as variáveis apresentaram distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER & BELLE, 1993). Foi utilizado o programa Biostat® versão 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. SEMEN COLETADO E PRÉ-REFRIGERADO

O comportamento das variáveis estudadas foi idêntico (P>0,05) para todos os animais utilizados no experimento, não se constatando efeito dos bodes sobre os parâmetros seminais antes ou após os dois tempos de refrigeração bem como durante o teste de exaustão.

Os dados referentes às médias e desvio padrão (± dp) dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado (CASA) e a morfologia espermática do sêmen caprino *in natura* e pré-refrigeração diluídos em Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite (GGL) e Glicina-Gema-Leite suplementado com Trolox® e Catalase (GGL_{tc}), estão dispostos na Tabela 1.

A média e desvio padrão (± dp) da motilidade total (MT) espermática no sêmen *in natura* foram de 86,6 ± 5,9%. Esses valores corrobora com os observados por Bispo (2005) que obteve valores médios e desvio padrão de motilidade total de 82,33 ± 9,79%, assemelham-se ainda aos encontrados por Betini et al. (1998) de 86,00 ± 1,08%, por Azerêdo et al. (2001) de 85,41 ± 4,65%, e Siqueira et al.,(2009) de 82,7±5,2%.

A MT e MP dos espermatozóides no sêmen diluído pré-refrigeração foram para o GL: 85,8 ± 12,1% e 61,5 ± 11,2%; para o GGL: 87,8 ± 9,2% e 62,0 ± 8,9% e para o GGL_{tc}; 90,1 ± 7,8% e 64,1 ± 7,7% respectivamente, não havendo diferença (P>0,05) entre os diluidores e nem ao se comparar com as obtidas no sêmen *in natura*.

Já Siqueira et al. (2009) no sêmen diluído em Tris-Frutose-Gema a 2,5% na pré-refrigeração obtiveram valores de MT espermática (± dp) de 83,0 ± 5,00 %, e Viana et al., (2006) para este parâmetro espermático obtiveram com os diluidores Leite Desnatado Glicose, 83,59 ± 9,69 % e com o Tris-Gema, 84,06 ± 8,46 %.

Os valores encontrados neste experimento, assim como os dados dos autores citados, estão de acordo com os padrões preconizados para o sêmen caprino que se encontram no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Nele, a recomendação é de que para o processamento e a utilização do sêmen caprino fresco, os valores de motilidade e vigor espermáticos estejam acima de 70% e 3,0 (escala de 0 a 5), respectivamente. Também pode ser observado que ocorreu uniformidade dos parâmetros analisados, ao se comparar os diluidores.

TABELA 1: Médias ± desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado e morfologia espermática do sêmen caprino *in natura* e diluído pré-refrigeração nos meios Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite (GGL) e Glicina-Gema-Leite suplementado com Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	***In natura***	**Pré-Refrigeração**		
		GL	**GGL**	**GGL_{tc}**
MT (%)	86,6 ± 5,9	85,8 ± 12,1	87,8 ± 9,2	90,1 ± 7,8
MP (%)	59,6 ± 12,6	61,5 ± 11,2	62,0 ±8,9	64,1 ± 7,7
VAP (μ m/s)	132,8 ± 23,3	130,6 ± 32,1	154,1 ± 22,0	145,7 ± 13,2
VSL (μ m/s)	113,6 ± 23,4	113,9 ± 33,1	133,1 ± 17,8	125,2 ± 12,8
VCL (μ m/s)	207,9 ± 38,9	207,8 ± 39,8	220,1 ± 47,2	202,6 ± 27,7
ALH (μ m)	6,4 ± 1,0	6,6 ± 1,2	6,2 ± 1,4	5,8 ± 0,9
BCF (Hz)	43,5 ± 4,3	41,3 ± 8,4	44,8 ± 4,0	42,2 ± 4,3
STR (%)	82,5 ± 6,9	84,5 ± 6,3	84,7 ± 2,4	84,2 ± 3,9
LIN (%)	54,1 ± 9,9	54,5 ± 11,0	59,0 ± 7,0	61,1 ± 7,0
INTEGR (%)	72,9 ± 13,4	71,5 ± 13,7	70,0 ± 11,8	73,8 ± 8,8
ACROS (%)*	1,6 ± 3,2	-	-	-
CAUDA (%)*	5,2 ± 4,2	-	-	-

Análise computadorizada (CASA): MT – Motilidade total; **MP** – Motilidade progressiva; **VAP** – velocidade de trajeto; **VSL** – Velocidade progressiva; **VCL** – Velocidade curvilinear; **ALH** – Amplitude lateral da cabeça; **BCF** – Freqüência de batimento do flagelo; **STR** – Retilinearidade; **LIN** – Linearidade.
Morfologia espermática – **Acros** – acrossomo lesado e **Cauda** – cauda dobrada.
IMB – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente
(P>0,05 entre os meios e momentos para todos os parâmetros)
***** Não foram coletados amostras para a Integridade de Acrossomo e Cauda Dobrada, na pré-refrigeração

Os parâmetros espermáticos de morfologia (acrossomo lesado e cauda dobrada) observados na Tabela 1 estão de acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), que estabelece que o porcentual de patologias no sêmen a ser utilizado para procedimentos de armazenamento possua no máximo 20% de defeitos espermáticos totais.

Para os parâmetros espermáticos de VAP, VSL, ALH, BCF, STR, LIN, obtidos após a diluição e na pré-refrigeração, não se detectou diferença (P>0,05) entre as amostras processadas nos três diluidores e nem ao se comparar as amostras diluídas com o sêmen *in natura*.

O comportamento das variáveis estudadas foi semelhante (P>0,05) em todas as amostras de sêmen dos seis animais utilizados no experimento.

6.2. REFRIGERAÇÃO POR 24 HORAS OU 48 HORAS

A temperatura ambiente média ficou entre 20,7ºC e 25,9ºC durante a padronização da refrigeração no sistema Equitainer®, que com o uso do lastro térmico adaptado para o experimento, as curvas de refrigeração (Anexo II) tiveram queda de 0,15 a 0,25ºC/minuto durante a primeira hora e queda de 0,3ºC até a estabilização do sistema, mantendo-se até o final das 48 horas a temperatura de 5ºC.

Os valores de MT e MP dos espermatozóides no sêmen caprino realizado após refrigeração de 24 horas e 48 horas em sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 2.

Não ocorreu diferença na MT espermática ao se comparar os diluidores nos diversos momentos experimentais (P>0,05), também para a MT espermática não houve diferença (P>0,05) entre os tempos pré-refrigeração (85,8 ± 12,1%), pós-refrigeração por 24 horas (85,0 ± 10,3%) e 48 horas (80,0 ± 17,0%) ao se utilizar o diluidor GL. Entretanto, observou-se diferença (P<0,05) nas médias (± dp) da MT espermática entre a pré-refrigeração (87,8 ± 9,2%) e o pós-refrigeração de 48horas (57,1 ± 34,8%) nas amostras diluídas

em GGL, o mesmo ocorrendo com o GGL_{tc} entre as amostras na pré (90,1 ± 7,8%) e pós-refrigeração de 48 horas (64,8 ± 29,5%).

TABELA 2: Médias ± desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT) e Progressiva (MP) avaliados no sistema computadorizado CASA do sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Pré-Refrigeração (T=0)	Refrigeração (h)	
		24	48
MT (Motilidade total - %)			
GL	85,8 ± 12,1	85,0 ± 10,3	80,0 ± 17,0
GGL	87,8 ± 9,2[a]	77,3 ± 18,3[ab]	57,1 ± 34,8[b]
GGL_{tc}	90,1 ± 7,8[a]	78,5 ± 12,3[ab]	64,8 ± 29,5[b]
MP (Motilidade Progressiva - %)			
GL	61,5 ± 11,2[a]	57 ± 11,5[ab]	44,1 ± 15,5[b]
GGL	62,0 ± 8,9[a]	49,0 ± 17,2[ab]	35,3 ± 22,5[b]
GGL_{tc}	64,1 ± 7,7[a]	51,1 ± 12,4[ab]	38,5 ± 21,5[b]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

O GL é um diluente já estudado que mantém a viabilidade durante a refrigeração e é muito eficiente em relação à motilidade espermática. Nunes e Feliciano Silva (1984) concluíram que o sêmen caprino refrigerado a 4ºC no diluidor leite desnatado-glicose é viável até 12 horas de resfriamento, apresentando até este momento excelentes características *in vitro*, não concordando com os resultados obtidos no presente estudo onde o diluidor GL se manteve por até 48 horas sua motilidade.

No trabalho de Viana et al. (2006), a diminuição da Motilidade dos espermatozóides declinou em um ritmo de 25% por dia de armazenamento, concordando com Evans e Maxwell (1987) que referem uma taxa de 10 a 35% de redução da motilidade por dia de resfriamento. Desta forma o período máximo de conservação para obter nível aceitável de fertilidade para IA é de 48

horas para caprinos, considerando que para essa espécie se pode realizar uma IA mais profunda. Porém os resultados obtidos neste estudo mostra que o sêmen pré e pós-refrigerado a 24 ou 48 horas na amostra diluída em GGL e GGL_{tc} tiveram queda na motilidade menor que 15% por dia.

Bispo (2005) estudando sêmen caprino obteve MT espermática, às 24 horas de refrigeração de 56,0 ± 3,0% e às 48 horas de 36,5 ± 2,2%, Azawi et al.,(1993) ao avaliarem seis diluidores diferentes, observaram que os melhores resultados, em diferentes tempos de estocagem, foram obtidos com o diluidor Tris-frutose-gema, com motilidade de 53,1%, com 24 horas de armazenamento, e 21,7% com 120 horas de armazenamento, porém as 48 horas foi 46,1±1,3 % sendo resultados abaixo dos obtidos neste experimento.

Para a MP espermática constatou-se diferença (P<0,05) entre os momentos pré e pós-refrigeração por 48 horas para os diluidores GL (61,5 ± 11,2 *vs* 44,1 ± 15,5%), GGL (62,0 ± 8,9 *vs* 35,3 ± 22,5%) e , GGL_{tc} (64,1 ± 7,7 *vs* 38,5±21,5%), sem que houvesse diferença (P>0,05) entre os diluidores.

Os parâmetros espermáticos de VAP, VSL e VCL obtidos nos momentos de pré e pós-refrigeração, são apresentados na Tabela 3.

Para nenhum desses parâmetros houve diferença significativa (P>0,05), entre os tratamentos (GL, GGL e GGL_{tc}).

Houve diferenças (P<0,05), nos parâmetros espermáticos de VAP para o GL entre os momentos pré e pós-refrigeração por 48 horas (130,6 ± 32, *vs* 97,9 ± 21,7 µm/s) e entre a pré e pós-refrigeração por 24 horas com a refrigeração por 48 horas para o GGL (154,1 ± 22,0 e 121,4 ± 23,4 *vs* 83,5 ± 47,2 µm/s) e para o GGL_{tc} (145,7 ± 13,2 e 125,5 ± 26,0 vs 94,0 ± 41,6 µm/s).

TABELA 3: Médias ± desvio padrão dos parâmetros de velocidade de trajeto (VAP); Velocidade progressiva (VSL) e Velocidade curvilinear (VCL) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Pré-Refrigeração T=0	Refrigeração(h)	
		24	48
VAP (Velocidade de trajeto - µm/s)			
GL	130,6 ± 32,1[a]	114,8 ± 17,5[ab]	97,9 ± 21,7[b]
GGL	154,1 ± 22,0[a]	121,4 ± 23,4[a]	83,5 ± 47,2[b]
GGL_{tc}	145,7 ± 13,2[a]	125,5 ± 26,0[a]	94,0 ± 41,6[b]
VSL (Velocidade progressiva - µm/s)			
GL	113,9 ± 33,1[a]	94,6 ± 16,9[ab]	76,1± 18,1[b]
GGL	133,1 ± 17,8[a]	100,6 ± 17,7[b]	68,2 ± 40,9[c]
GGL_{tc}	125,2 ± 12,8[a]	106,9 ± 23,4[a]	78,7 ± 37,8[b]
VCL (Velocidade curvilinear - µm/s)			
GL	207,8 ± 39,8	192,6 ± 19,1	182,6 ± 33,7
GGL	220,1 ± 47,2[a]	205,3 ± 50,4[ab]	146,7 ± 86,2[b]
GGL_{tc}	202,6 ± 27,7	206,3 ± 50,9	158,39 ± 68,3

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Alguns pesquisadores têm ressaltado que os resultados obtidos com VCL e VAP podem ser utilizados para previsão da capacidade fertilizante do espermatozóide, em virtude tanto da importância da capacitação no processo de fertilização, quanto pelo fato de que esses parâmetros são aumentados durante essa fase de preparação espermática para o processo de fertilização. Uma vez que a capacitação é seguida pela hiperativação, a identificação de espermatozóides hiperativados é de fundamental importância, tendo sido observado em amostras de sêmen com boa capacidade de fertilização (MORTIMER, 1997)

Para a VSL espermática as diferenças (P<0,05) ocorreram nas amostras diluídas em GL entre os momentos pré e pós-refrigeração por 48 horas (113,9 ± 33,1 *vs* 76,1 ± 18,1 µm/s).Já para as diluídas em GGL, os valores foram decrescentes (P<0,05) entre os momentos pré-refrigeração (133,1±17,8 µm/s) e pós-refrigeração por 24 horas (100,6 ± 17,7 µm/s), e por 48 horas (68,2 ± 40,9 µm/s). Para as alíquotas diluídas em GGL_{tc}, houve diferenças (P<0,05) entre os momentos de pré e de pós-refrigeração por 24 horas em relação ao de pós-refrigeração por 48 horas (125,2 ± 12,8 e 106,9±23,4 *vs* 78,7±37,8 µm/s).

Amostras diluídas em GGL apresentaram declínio da VCL espermática, ao se comparar os momentos pré com o de pós-refrigeração por 48 horas (220,1 ± 47,2 *vs* 146,7 ± 86,2 µm/s; P<0,05). Não houve diferença (P>0,05) para este parâmetro ao se comparar os diluidores e nem ao se comparar os momentos para o sêmen diluído em GL ou $GGL_{tc.}$

Os resultados obtidos para a VCL espermática são superiores ao citado por Melo (2010) cuja média (± dp) nos momentos da pré-refrigeração e pós-refrigeração por 24 ou 48 horas foram de 106,5 (± 8,0); 40,6(± 11,9) e 37,4 (± 13,3) µm/s respectivamente.

Sousa (2002) obteve valores superiores no parâmetro VCL entre os tratamentos geladeira *vs* sistema Equitainer® para o sêmen ovino. Essa superioridade foi atribuída à provável estabilidade da temperatura no sistema Equitainer®, havendo menos depleção da fonte energética devido à manutenção do metabolismo espermático reduzido, permitindo uma melhor qualidade do sêmen ao final do período.

Os parâmetros espermáticos ALH, BCF,STR e LIN são apresentados na tabela 4.

Nestes parâmetros não houveram diferenças significativa (P>0,05), entre os tratamentos.

TABELA 4: Médias ± desvio padrão dos parâmetros da Amplitude lateral da cabeça (ALH); Freqüência de batimento do flagelo (BCF); Retilinearidade (STR); Linearidade (LIN), avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Pré-Refrigeração T=0	Refrigeração (h)	
		24	48
ALH (Amplitude de deslocamento lateral da cabeça - µm)			
GL	6,6 ±1,2	6,5 ± 0,7	7,2 ± 0,8
GGL	6,2 ±1,4	6,8 ± 1,7	5,1 ± 3,3
GGL_{tc}	5,8 ±0,9	6,6 ± 1,7	5,3 ± 2,6
BCF (Freqüência de batimento do flagelo - Hz)			
GL	41,3 ± 8,4	40,6 ± 7,1	35,0 ± 7,6
GGL	44,8 ± 4,0[a]	43,0 ± 5,8[ab]	34,1 ± 17,0[b]
GGL_{tc}	42,2 ± 4,3	44,9 ± 6,4	38,8 ± 14,4
STR (Retilinearidade - %)			
GL	84,5 ± 6,3[a]	80,3 ± 3,8[ab]	76,8 ± 6,8[b]
GGL	84,7 ± 2,4[a]	81,0 ± 3,7[ab]	63,8 ± 32,6[b]
GGL_{tc}	84,2 ± 3,9	82,9 ± 4,2	72,3 ± 25,9
LIN (Linearidade - %)			
GL	54,5 ±11,0[a]	52,4 ± 2,5[ab]	42,0 ± 6,0[b]
GGL	59,0 ± 7,0[a]	52,5 ± 2,3[a]	37,2 ± 18,5[b]
GGL_{tc}	61,1 ± 7,0[a]	53,6 ± 2,8[ab]	43,7 ± 15,9[b]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Para nenhum dos diluidores o ALH apresentou diferença entre a pré e pós-refrigeração (P>0,05) e entre os momentos.

Já na BCF espermático, o sêmen diluído em GGL apresentou diferença (P>0,05) pós-refrigeração de 48horas (34,1±17,0 Hz) em relação a pré-refrigeração (44,8±4,0 Hz) não se constatando o mesmo para as amostras diluídas em GL ou GGL_{tc}, que permaneceram constantes.

Os valores de Retilinearidade (STR) representam uma comparação percentual da linha reta em relação a linha média das trajetórias, e portanto fornecem uma indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória geral do espermatozóide. Um alto valor de STR mostra que o caminho médio percorrido pelo espermatozóide está próximo do caminho em linha reta e um valor baixo indica o caminho médio mais curvilíneo (MORTIMER, 1997).

A STR espermática declinou ($P<0,05$) após 48 horas de refrigeração nas amostras diluídas em GL e GGL, permanecendo inalterada naquelas diluídas em GGL_{tc}..

A linearidade (LIN) é uma comparação percentual da linha reta com as trajetórias curvilíneas. Uma trajetória espermática circular tem uma baixa LIN, o caminho curvilíneo seria muito maior do que o espaço ganho e uma alta LIN na trajetória indica que o espermatozóide tem o seu movimento mais próximo de uma reta (MORTIMER, 1997).

Também a LIN, declinou ($P<0,05$) após as 48 horas de refrigeração no sêmen em todos os diluidores empregados, sem que houvesse diferença ($P>0,05$) entre eles ao se analisar este parâmetro. Com isto deduz-se que os espermatozóides caprinos apresentaram a trajetória mais curvilínea após 48 horas de refrigeração no sistema Equitainer®.

Os parâmetros de integridade da membrana plasmática, acrossomo lesado e cauda dobrada, antes e após a refrigeração são apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5: Médias ± desvio padrão dos parâmetros de integridade total de membrana espermática em microscopia de epifluorescencia, morfologia espermática - Acrossomo (lesado) e Cauda (caudas dobradas), no sêmen caprino pré-refrigeração (T=0), pós-refrigeração 24 ou 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementada com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Pré-Refrigeração T=0	Refrigeração (h)	
		24	48
Integridade de membrana plasmática (%)			
GL	71,5±13,7	74,7±10,8	61,5±16,2
GGL	70,0 ±11,8	67,1±16,8	52,8±26,7
GGL_{tc}	73,8 ± 8,8	68,1±13,6	61,8±24,9
Acrossomo lesado (%)			
GL	$1,7±3,2^{b}$*	$9,4±7,5^{aA}$	$11,1±8,8^{a}$
GGL	$1,7±3,2^{b}$*	$3,5±4,2^{abB}$	$23,0±34,0^{a}$
GGL_{tc}	1,7 ±3,2*	$2,6±4,1^{B}$	4,2±4,2
Cauda dobrada (%)			
GL	5,2±4,2*	8,7±4,8	9,6±10,4
GGL	5,2±4,2*	6,5±6,6	6,0±5,3
GGL_{tc}	5,2±4,2*	6,6±4,6	7,4±5,5

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey

***** Não foram coletados amostras para a Integridade de Acrossomo e Cauda Dobrada, na pré-refrigeração

.

Por não ter sido realizada a coleta de dados de acrossomo lesado e cauda dobrada na pós-diluição/pré-refrigeração foram utilizados os dados obtidos nas amostras de sêmen *in natura*.

Não houve efeito (P>0,05) do processo de refrigeração por 24 ou 48 horas e nem dos meios diluidores empregados, sobre a integridade de membrana plasmática e cauda dobrada.

O diluidor GGL_{tc} conferiu melhor proteção ao acrossomo uma vez que manteve os percentuais de acrossomos lesados mais estáveis (entre 1,66 ± 3,2 e 4,2 ± 4,2%) durante o processo de refrigeração de até 48 horas e manteve

valores inferiores aos obtidos no sêmen diluído com GL após as 24 horas de refrigeração (2,6 ± 4,1 *vs* 9,4 ± 7,5%).

Deka e Rao (1985) encontraram valores de patologias acrossômica de 4,42% e 4,48% no sêmen diluído em meios a base de Tris-gema-glicerol e leite desnatado-glicerol, respectivamente, após resfriamento a 5ºC e resultados semelhantes foram obtidos por DEKA e RAO (1987), que observaram média de 5,30% de patologias acrossomica após resfriamento de sêmen a 5ºC utilizando curva rápida (1ºC/min.), e quando submetido a uma curva lenta (0,2ºC/min), encontraram média de 2,97% de patologias acrossômica.

Azêvedo e Toniolli (2000) encontraram valores semelhantes aos obtidos neste estudo ao refrigerar sêmen caprino com leite desnatado, 6,9% e 10,5% após 24 e 48 horas de resfriamento respectivamente.

Roca et al. (1997) avaliaram as médias de acrossomos normais no sêmen de bodes da raça granadino-murciano resfriado a 5ºC em diluidor a base de tris gema, centrifugado e não centrifugado, observando a porcentagem de acrossomos normais de 75% e 68%, respectivamente, após 96 horas de conservação.

No trabalho de Viana et al. (2006), os resultados da média e (±dp) da patologia de cauda no sêmen refrigerado a 5ºC e diluído em leite desnatado-glicose em 24 horas (14,1±5,1%) e em 48 horas (16,2±6,5%), e no meio Tris-gema (12,1±6,7%) em 24 horas e (15,3±5,1%) em 48 horas de refrigeração, Nunes e Feliciano Silva (1984), ao avaliarem o sêmen caprino diluído em leite desnatado-glicose e refrigerado a 4ºC encontraram percentual de patologias de cauda de 8,6% pré-refrigeração e 13,6% no pós-refrigeração de 24 horas, esses resultados demonstram que em relação ao percentual de patologia de cauda os resultados obtidos no presente estudo foram inferiores.

Figueirêdo et al.(2002) refrigeraram sêmen caprino a 4ºC diluído em água de coco e observaram menor porcentagem de patologia de cauda, pré-refrigeração (5,37%) e pós-refrigeração de 24horas (3,11%) e pós-refrigeração de 48 horas (5,33%).

Esse resultado pode ser decorrente a presença de antioxidantes com capacidade hidrossolúvel (Trolox® e Catalase). Segundo Sinha (1996); Maxwell e Stojanov (1996) esses antioxidantes adicionados ao meio diluente atuam na preservação, sobrevivência e mantença da integridade de acrossoma dos espermatozóides durante a refrigeração.

Sendo o Trolox® um análogo hidrossolúvel da vitamina E, é o principal antioxidante de membrana (ALBERTINI e ABUJA, 1999 apud MAIA, 2006), por isso a apresentação do maior porcentual de células com acrossoma íntegros por até 48 horas de refrigeração. Concluindo que a ação do antioxidante Trolox® foi fundamental ao meio diluente durante a refrigeração porque ele é distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídios das biomembranas tornando-se excelente protetora contra lipoperoxidação (MAIA et al., 2009).

No sêmen ovino criopreservado no diluidor Tris-gema aditivado ou não de Trolox-C e catalase, Maia (2006) detectou a geração de O_2 -., H_2O_2 e OH^- (Lipoperoxidação) tanto no sêmen congelado na presença quanto na ausência dos antioxidantes, indicando que o processo de criopreservação induz à geração de ROS nessa espécie.

No sêmen ovino criopreservado, Maia et al. (2009) avaliaram o efeito da adição dos antioxidantes catalase, Trolox® e da combinação Trolox® e catalase, ao diluidor Tris-gema, sobre a motilidade e a viabilidade espermática e observaram que a adição de catalase ao diluidor teve um efeito benéfico na motilidade quando comparado às amostras congeladas no diluidor contendo Trolox®, no entanto não melhorou esse parâmetro, em relação ao controle (sem antioxidantes). Contudo, ambos os antioxidantes, Trolox® e catalase, foram hábeis em preservar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, quando comparado ao controle.

6.3. TESTE DE EXAUSTÃO APÓS 24 HORAS DE REFRIGERAÇÃO

A incubação do sêmen à temperatura de 37ºC após o processo de refrigeração visa caracterizar um desafio que exija dos espermatozóides e do ambiente de incubação, representada pelo diluidor, uma condição de compensação metabólica capaz de preservar o quanto possível os parâmetros espermáticos inalterados ao longo do tempo. A intenção não é reproduzir as condições fisiológicas a serem enfrentadas pelos espermatozóides após a inseminação, mas sim estabelecer patamares desafiadores crescentes às condições metabólicas das células mantidas em um sistema *in vitro.*

Os valores de MT e MP dos espermatozóides no sêmen caprino durante o transcurso do teste de exaustão realizado após refrigeração por 24 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6: Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino, durante o Teste de Exaustão Pós-Refrigeração de 24 horas, nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Exaustão Pós-Refrigeração 24 horas (min)				
	0	30	60	120	240
MT (Motilidade Total - %)					
GL	85,0±10, 3^{a}	79,0±13,6^{ab}	78,1±13,2^{ab}	73,3±15,4^{abA}	61,7±32,2^{bA}
GGL	77,3±18,3^{a}	73,5±19,7^{a}	64,1±27,1^{ab}	42,3±25,7^{bcB}	19,6±26,7^{cB}
GGL_{tc}	78,5±12,3^{a}	70,8±17,0^{a}	67,0±19,6^{a}	57,4±22,4^{aAB}	28,5±29,5^{bB}
MP (Motilidade Progressiva - %)					
GL	57,0±11,5	57,7±16,2	55,5±16,4	45,4±19,2	37,9±22,8^{A}
GGL	49,0±17,2^{a}	50,3±18,7^{a}	44,2±21,5^{a}	28,4±22,4^{ab}	10,5±20,8^{bB}
GGL_{tc}	51,1±1 2,4^{a}	48,1±15,4^{a}	45,7±16,2^{a}	38,4±20,7^{a}	14,7±22,3^{bB}

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e por diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

O sêmen adicionado de qualquer um dos diluidores apresentou o mesmo padrão de MT espermática até 60 minutos de incubação. Aos 120 e 240 minutos constatou-se que a amostra de sêmen diluída em GL (73,3 ± 15,4 e 61,7 ± 32,2%), apresentou MT superior (P<0,05) às diluídas em GGL_{tc} (57,4 ± 22,4 e 28,5 ± 29,5%) e em GGL (42,3 ± 25,7 e 19,6 ±26,7%).

Os valores de MP espermática mantiveram-se semelhantes até 120 minutos de incubação nas amostras diluídas em GGL ou GGL_{tc}.

A amostra de sêmen diluída em GL manteve valores semelhantes de MP espermática em todos os momentos de incubação, sendo aos 240 minutos superior aos obtidos naquelas diluídas em GGL ou GGL_{tc}.

Os parâmetros espermáticos de VAP, VSL e VCL no sêmen caprino durante o transcurso do teste de exaustão realizado após refrigeração de 24 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 7.

Ao serem considerados os parâmetros das velocidades espermáticas (VAP, VSL e VCL), constata-se diferença apenas no momento 240 minutos do teste de exaustão entre as amostras diluídas em GL em relação às demais (GGL e GGL_{tc}). Observa-se ainda que ao se comparar individualmente cada um dos diluidores, as velocidades espermáticas mantiveram-se semelhantes até pelo menos os 60 minutos de incubação.

TABELA 7: Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de velocidade de trajeto (VAP); Velocidade progressiva (VSL) e Velocidade curvilinear (VCL) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão Pós-Refrigeração de 24 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Exaustão Pós-Refrigeração 24 horas (min)				
	0	30	60	120	240
VAP (Velocidade de Trajeto - µm/s)					
GL	114,8±17,5^{a}	115,4±18,4^{a}	106,8±20,7^{a}	95,6±19,4^{ab}	77,7±39,4^{bA}
GGL	121,4±23,4^{a}	113,6±20,4^{a}	100,7±25,3^{ab}	73,6±34,1^{b}	30,0±29,6^{cB}
GGL_{tc}	125,5±26,0^{a}	120,4±20,7^{a}	103,6±20,8^{ab}	86,1±26,6^{b}	40,9±37,6^{cB}
VSL (Velocidade Progressiva - µm/s)					
GL	94,6±16,9^{a}	97,8±18,7^{a}	91,4±21,0^{ab}	78,2±18,7^{ab}	65,3±34,7^{bA}
GGL	100,6±17,7^{a}	97,3±16,5^{a}	87,4±18,9^{ab}	63,8±30,4^{b}	25,8±26,2^{cB}
GGL_{tc}	106,9±23,4^{a}	104,1±17,8^{a}	90,7±17,4^{ab}	75,8±25,3^{b}	35,2±33,1^{cAB}
VCL (Velocidade Curvilinear - µm/s)					
GL	192,6±19,1^{a}	189,3±16,8^{a}	177,5±22,4^{ab}	154,8±45,4^{ab}	135,1±65,5^{bA}
GGL	205,3±50,4^{a}	183,6±39,4^{ab}	161,6±37,7^{ab}	132,4±62,9^{b}	54,9±53,4^{cB}
GGL_{tc}	206,3±50,9^{ab}	190,4±36,8^{ab}	249,5±294,0^{a}	143,6±35,3^{ab}	68,2±59,2^{bB}

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores de ALH, BCF, STR e LIN dos espermatozóides no sêmen caprino durante o transcurso do teste de exaustão após o tempo de refrigeração de 24 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 8.

O diluidor GL foi capaz de preservar as características de cinética espermática (ALH, BCF, STR e LIN) das amostras após a refrigeração por 24 horas e incubação à 37ºC até 240 minutos sendo que para os outros dois diluidores as alterações da qualidade dos movimentos espermáticos foram observadas aos 120 para a ALH (4,2 ± 2,3 µm) no GGL ou aos 240 minutos, para os demais parâmetros.

TABELA 8: Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos da Amplitude lateral da cabeça (ALH); Freqüência de batimento do flagelo (BCF); Retilinearidade (STR); Linearidade (LIN), avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão Pós-Refrigeração de 24 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Exaustão Pós-Refrigeração 24 horas (min)				
	0	30	60	120	240
ALH (Amplitude de deslocamento lateral da cabeça - µm)					
GL	6,5±0,7	6,3 ± 0,7	6,0±0,9	5,8±1,2	5,0±2,4^{A}
GGL	6,8±1,7^{a}	6,0±1,3^{ab}	5,5±1,1^{ab}	4,2±2,3^{bc}	2,4±2,5^{cB}
GGL_{tc}	6,6±1,7^{a}	5,9±1,4^{a}	5,6±1,1^{a}	5,3±1,3^{a}	2,7±2,4^{bAB}
BCF (Freqüência de batimento do flagelo - Hz)					
GL	40,6±7,1	42,0±5,8	40,6±7,7	39,2±7,2	31,9±16,5
GGL	43,3±5,8^{a}	43,8±5,2^{a}	42,3±5,6^{a}	37,4±13,7^{a}	19,3±18,6^{b}
GGL_{tc}	44,9±6,4^{a}	44,9±5,3^{a}	44,0±5,5^{a}	41,3±6,7^{a}	23,3±20,1^{b}
STR (Retilinearidade - %)					
GL	80,8±3,8	83,1±5,7	84,2±6,8	82,7±6,3	68,5±32,5
GGL	81,0±3,7^{a}	83,4±4,2^{a}	85,4±4,3^{a}	77,9±25,1^{a}	48,3±42,8^{b}
GGL_{tc}	82,9±4,2^{a}	84,2±3,9^{a}	85,5±4,6^{a}	86,0±5,8^{a}	55,5±41,2^{b}
LIN (Linearidade - %)					
GL	49,1±6,1	51,5±6,7	52,0±9,6	50,0±7,7	39,9±19,6
GGL	49,5±6,6^{a}	52,1±4,5^{a}	53,6±4,8^{a}	44,8±16,7^{a}	27,0±24,1^{b}
GGL_{tc}	52,0±8,7^{a}	54,5±7,0^{a}	53,7±6,0^{a}	52,3±9,6^{a}	33,5±25,3^{b}

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Os percentuais de integridade total de membrana espermática e da morfologia espermática no sêmen caprino durante o transcurso do teste de exaustão realizado após refrigeração de 24 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 9.

TABELA 9: Médias ± desvio padrão dos parâmetros de integridade total de membrana espermática em microscopia de epifluorescencia, morfologia espermática - Acrossomo (lesado) e Cauda (caudas dobradas), no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 24 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Exaustão Pós-Refrigeração 24 horas (min)				
	0	30	60	120	240
Integridade de Membrana Plasmática (%)					
GL	74,7±10,8^{a}	68,5±13,0^{a}	59,6±19,1^{ab}	57,5±14,7^{abAB}	43,7±24,4^{b}
GGL	67,1±16,8^{a}	58,5±25,5^{ab}	55,6±25,7^{ab}	54,3±26,4^{abB}	32,5±30,6^{b}
GGL_{tc}	68,1±13,6^{ab}	69,0±9,5^{ab}	70,5±9,5^{ab}	73,3±10,8^{aA}	49,1±37,5^{b}
Acrosssoma lesado (%)					
GL	9,4±7,5^{bA}	14,0±10,3^{abA}	22,6±14,1^{abA}	23,1±12,5^{abA}	24,0±26,6^{a}
GGL	3,5±4,2^{bB}	8,1±6,4^{bAB}	7,1±8,4^{bB}	17,3±19,2^{abAB}	33,1±38,6^{a}
GGL_{tc}	2,6±4,1^{bB}	5,0±4,0^{bB}	5,1±4,5^{bB}	6,4±4,7^{bB}	36,7±36,9^{a}
Cauda Dobrada (%)					
GL	8,7±4,8	9,5±7,8	6,5±5,8	6,5±6,2	15,1±26,8
GGL	6,5±6,6	7,0±4,4	9,1±4,1	8,9±9,1	21,2±34,9
GGL_{tc}	6,6±4,6	5,2±4	8,5±4,2	8,9±4,8	6,5±4,8

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Para a Integridade de Membrana Plasmática dos espermatozóides, ocorreram diferenças (P<0,05) entre os meios a partir do momento 120 minutos, onde com o GGL_{tc} (73,3 ± 10,8%) apresentou valores superiores entre aos obtidos com os meios GL (57,5 ± 14,7%) e GGL (54,3 ± 26,4%).

Ocorreram diferenças no percentual de acrossomo lesado entre os meios a partir do momento 0 minuto de incubação a 37ºC após a refrigeração por 24 horas, onde para o GL obteve-se maior valor que para o GGL e GGL_{tc}, superioridade que se manteve até o tempo de 120 minutos.

Os melhores desempenhos para estas variáveis foram obtidas na amostras diluídas com GGL_{tc} que manteve os menores valores por até 120 minutos do teste de exaustão após refrigeração de 24 horas.

Para a ocorrência de Cauda dobrada dos espermatozóides, não se constatou diferença (P>0,05) nas amostras processadas com os diferentes diluídores e nem entre os momentos do teste de exaustão, após a refrigeração por 24 horas.

6.4. TESTE DE EXAUSTÃO APÓS 48 HORAS DE REFRIGERAÇÃO

Os valores de MT e MP dos espermatozóides no sêmen caprino durante o transcurso do teste de exaustão realizado após refrigeração por 48 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 10.

O sêmen adicionado de qualquer um dos diluidores apresentou o mesmo padrão para a MT espermática e para a MP espermática até 120 minutos de incubação a 37ºC após um período de refrigeração de 48 horas.

No momento 240 minutos para as amostras diluídas em GL (45,5 ± 30,5%) apresentaram maiores valores (P<0,05) em relação àquelas diluídas em GGL (14,2 ± 24,3%) e GGL_{tc} (26,0 ± 35,1%). Não se observou diferença no efeito dos diluidores sobre a MP nos diferentes momentos do teste de exaustão.

TABELA 10: Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino, durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas, nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Exaustão Pós-Refrigeração 48 horas (min)				
	0	30	60	120	240
Motilidade Total (%)					
GL	$80,0±17,0^{a}$	$70,0±26,0^{ab}$	$68,7±26,2^{ab}$	$51,8±34,1^{ab}$	$45,5±30,5^{bA}$
GGL	$57,1±34,8^{a}$	$55,0±34,2^{a}$	$54,2±34,6^{a}$	$38,6±33,4^{ab}$	$14,2±24,3^{bB}$
GGL_{tc}	$64,8±29,5^{a}$	$61,4±29,6^{ab}$	$59,1±32,8^{ab}$	$43,5±33,6^{ab}$	$26,0±35,1^{bB}$
Motilidade Progressiva (%)					
GL	$44,1±15,5^{a}$	$42,5±20,0^{ab}$	$39,8±20,5^{ab}$	$26,6±21,9^{ab}$	$20,5±19,6^{b}$
GGL	$35,3±22,5^{a}$	$37,2±27,0^{a}$	$37,3±25,4^{a}$	$23,2±19,5^{ab}$	$8,5±19,2^{b}$
GGL_{tc}	$38,5±21,5^{ab}$	$44,2±23,9^{a}$	$41,3±24,5^{ab}$	$26,3±23,8^{ab}$	$14,5±25,3^{b}$

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey

Os parâmetros de VAP, VSL e VCL dos espermatozóides no sêmen caprino durante o transcurso do teste de exaustão após refrigeração de 48 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 11.

TABELA 11: Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos de velocidade de trajeto (VAP); Velocidade progressiva (VSL) e Velocidade curvilinear (VCL) avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Exaustão Pós Refrigeração 48 horas (min)				
	0	30	60	120	240
VAP (Velocidade de Trajeto - µm/s)					
GL	97,9±21,7	96,1±34,7	87,6±34,3	77,3±44,0	60,5±41,0
GGL	83,5±47,2[a]	83,7±47,6[a]	68,4±43,4[ab]	54,5±34,8[ab]	30,6±29,6[b]
GGL_{tc}	94,0±41,6[a]	94,2±40,9[a]	77,9±41,1[ab]	65,9±38,8[ab]	37,0±36,2[b]
VSL (Velocidade Progressiva - µm/s)					
GL	76,1±18,4	77,2±29,2	68,5±26,5	58,3±35,8	47,2±31,9
GGL	68,2±40,9[a]	71,2±42,4[a]	59,4±37,3[ab]	47,4±30,1[ab]	26,5±26,9[b]
GGL_{tc}	78,7±37,8[a]	81,2±37,5[a]	68,4±35,8[ab]	57,5±34,5[ab]	31,5±31,7[b]
VCL (Velocidade Curvilinear - µm/s)					
GL	182,6±33,7	168,1±57,1	152,8±59,1	139,1±73,7	111,6±73,5
GGL	146,7±86,2[a]	134,3±77,5[a]	110,9±69,4[ab]	95,9±58,9[ab]	53,1±50,9[b]
GGL_{tc}	158,3±68,3[a]	149,9±63,5[a]	126,0±62,7[ab]	116,0±61,4[ab]	65,6±62,2[b]

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Os parâmetros de velocidade espermática (VAP, VSL e VCL) avaliados durante o teste de exaustão por 240 minutos após a refrigeração do sêmen caprino por 48 horas, mantiveram-se equivalentes (P>0,05) nas amostras diluídas em GL.

Ao se comparar individualmente os diluidores, constata-se que as velocidades espermáticas mantiveram-se semelhantes (P>0,05) nas amostras diluídas em GGL ou GGL_{tc}, até os 120 minutos de incubação, observando-se menores velocidades apenas aos 240 minutos. Quanto as velocidades espermáticas, em nenhum dos momentos do teste de exaustão houve diferença (P>0,05) entre os diluidores GL, GGL ou GGL_{tc}.

Os valores de ALH, BCF, STR e LIN dos espermatozóides no sêmen caprino durante o teste de exaustão após refrigeração de 48 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 12.

TABELA 12: Médias ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos da Amplitude lateral da cabeça (ALH); Freqüência de batimento do flagelo (BCF); Retilinearidade (STR); Linearidade (LIN), avaliados no sistema computadorizado CASA no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas nos diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	**Exaustão Pós-Refrigeração 48 horas (min)**				
	0	**30**	**60**	**120**	**240**
ALH (Amplitude de deslocamento lateral da cabeça - µm)					
GL	7,2±0,8	6,1±2,1	5,7±2,1	4,9±3,0	4,8±3,1
GGL	5,1±3,3	4,3±2,7	3,9±2,5	3,9±2,3	2,3±2,4
GGL_{tc}	5,3±2,6	4,7±2,4	4,3±2,2	4,6±2,3	2,6±2,7
BCF (Freqüência de batimento do flagelo - Hz)					
GL	35,0±7,6	35,9±13,1	35,4±12,9	29,0±15,5	25,9±17,2
GGL	34,1±17	37,0±17,9	31,6±19,7	28,7±18,2	20,5±19,0
GGL_{tc}	38,8±14,4	39,5±13,6	35,8±17,5	32,5±17,3	22,9±20,8
STR (Retilinearidade - %)					
GL	76,8±6,8	72,3±23,8	71,7±23,8	62±30,5	57,5±35,4
GGL	63,8±32,6	66,7±33,7	63,7±38,6	63,8±38,6	48,3±43,3
GGL_{tc}	72,3±25,9	75,6±26,2	71,5±33,7	71,0±33,4	47,9±42,4
LIN (Linearidade - %)					
GL	42,0±6,0	42,5±15,1	42,6±15,4	35,0±18,3	32,1±20,5
GGL	37,2±18,5	42,0±21,2	39,9±24,4	36,5±22,4	27,7±25,2
GGL_{tc}	43,7±15,9	48,2±16,9	44,6±21,5	40,5±20,1	26,7±24,2

(P>0,05 entre os meios e momentos para todos os parâmetros)

Durante o teste de exaustão após refrigeração de 48 horas os parâmetros de ALH, BCF, STR e LIN, não apresentaram diferenças (P>0,05) entre diluentes e entre os momentos.

Os percentuais de integridade total de membrana espermática e da morfologia espermática no sêmen caprino durante o transcurso do teste de exaustão realizado após refrigeração de 24 horas no sistema Equitainer® são apresentados na Tabela 13.

TABELA 13: Médias ± desvio padrão dos parâmetros de integridade total de membrana espermática em microscopia de epifluorescencia, morfologia espermática - Acrossomo (lesado) e Cauda (caudas dobradas), no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 48 horas nos meios diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).

Diluidor	Exaustão Pós-Refrigeração 48 horas (min)				
	0	30	60	120	240
Integridade de Membrana Plasmática (%)					
GL	61,5±16,2^{a}	50,0±20,5^{ab}	42,5±23,6^{ab}	39,2±25,1^{ab}	31,6±23,2^{b}
GGL	52,8±26,7	48,7±26,6	48,0±27,7	44,9±31,4	25,0±26,1
GGL_{tc}	61,8±24,9	56,8±22,8	57,4±24,4	53,2±28,4	35,3±30,9
Acrossomo lesado (%)					
GL	11,1±8,8^{b}	28,5±28,1^{ab}	28,1±23,4^{abAB}	48,5±31,6^{a}	46,9±31,1^{aAB}
GGL	23±34,0^{b}	25,7±35,4^{ab}	34,3±32,0 ^{abA}	35,6±34,0^{ab}	63,4±27,3^{aA}
GGL_{tc}	4,2±4,2^{b}	5,0±2,1^{b}	9,6±14,4^{bB}	19,5±28,3^{ab}	32,3±29,0^{aB}
Cauda Dobrada (%)					
GL	9,6±10,4^{a}	6,5±6,4^{ab}	6,0±3,3^{ab}	2,3±3,1^{b}	3,5±4,0^{ab}
GGL	6,0±5,3	4,2±3,9	5,5±3,9	6,8±6,2	4,5±4,3
GGL_{tc}	7,4±5,5	7,0±5,3	5,1±3,8	6,5±4,7	7,5±5,7

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (P< 0,05) pelo teste de Tukey.

Para a porcentagem de integridade de membrana plasmática dos espermatozóides e de caudas dobradas, não se constatou diferenças (P>0,05)

entre os meios empregados para a refrigeração, em nenhum dos momentos de incubação durante o teste de exaustão.

Entretanto, as amostras diluídas em GL apresentaram declínio da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides no momento 240 minutos e em relação a patologia de cauda, apresentou diferença ($P<0,05$) entre os momentos, aos 120 minutos de incubação.

As amostras diluídas em GGL e GGL_{tc} não apresentaram variação nos parâmetros de Integridade de membrana plasmática e percentagem de caudas dobradas durante o teste de exaustão.

Considerando-se os percentuais de Acrossomo lesado, no sêmen submetido ao teste de exaustão após refrigeração por 48 horas, ocorreu diferença ($P<0,05$) entre os meios, nos momentos 60 e 240 minutos. Constatou-se, aos 60 minutos, menos lesões nas amostras diluídas em GGL_{tc} (9,6 ± 14,4%) do que nas diluídas em GL (28,1 ± 23,4%) ou GGL (34,3 ± 32,0%) e aos 240 minutos o maior percentual de lesões foi encontrado nas amostras diluídas em GGL (63,4 ± 27,3), GL (46,9 ± 31,1) *vs* GGL_{tc} (32,3 ± 29,0%).

Para todos os diluidores empregados as lesões acrossomais foram crescentes durante o teste de exaustão, havendo para todos, diferença entre o momento inicial em relação ao momento 240 minutos.

7. CONCLUSÃO

Diante das condições experimentais e com base nos dados obtidos, pode-se concluir:

7.1. O sistema Equitainer® de refrigeração com as adaptações realizadas foi eficiente em manter a viabilidade do sêmen caprino refrigerado a 5ºC por até 48 horas

7.2. Os diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL) e Glicina-Gema-Leite aditivado com 50 µMol/100x10^6 espermatozóides de Trolox® e 50 µg/mL(0,0935 U/mL) de Catalase; (GGL_{tc}) foram eficientes em manter adequados os parâmetros espermáticos de cinética e morfologia após refrigeração do sêmen à 5ºC por até 48 horas, sem haver diferenças entre os meios em todos os parâmetros estudados.

7.3. O diluidor GL manteve inalterados os parâmetros de motilidade espermática total (MT) por até 48 horas de refrigeração.

7.4. Havendo declínio da motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) dos espermatozóides após refrigeração do sêmen à 5ºC por 48 horas, independente do meio utilizado sendo também observado um declínio na velocidade curvilinear (VCL) nas amostras refrigeradas em GGL por 48 horas.

7.5. A refrigeração do sêmen à 5ºC por até 48 horas, independente do meio utilizado, tem pouca influência sobre o padrão de movimentação dos espermatozóides representados pelos parâmetros de velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e freqüência de batimento do flagelo (BCF) e confere aos espermatozóides trajetórias menos retilíneas representadas por menores percentuais de linearidade (LIN).

7.6. O meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo aditivado ou não de antioxidantes (50 µMol/100x10^6 espermatozóides de Trolox® e 50 µg/mL - 0,0935 U/mL de Catalase) confere melhor proteção ao acrossomo durante o processo de refrigeração por 24 horas.

7.7. A despeito do grande desafio representado pela incubação das amostras à 37ºC por longo tempo, após refrigeração por 24 ou 48horas, a maioria dos parâmetros espermáticos apresenta diferença em relação ao momento inicial apenas aos 240 minutos.

7.8. Durante o teste de exaustão após a refrigeração do sêmen por 24 horas o diluidor Glicose-Leite (GL) é capaz de manter mais elevada a motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP) velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva, (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) dos espermatozóides por um tempo superior aos diluidores Glicina-Gema-Leite aditivado ou não aditivado com antioxidantes.

7.9. A adição de antioxidantes (50 µMol/100x10^6 espermatozóides de Trolox® e 50 µg/mL - 0,0935 U/mL de Catalase) ao meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo confere melhor proteção ao acrossomo e integridade de acrossomo no transcorrer do teste de exaustão após a refrigeração do sêmen por 24 horas (até 120 minutos).

7.10. Durante o teste de exaustão após a refrigeração do sêmen por 48 horas o diluidor Glicose-Leite (GL) é capaz de manter mais elevada motilidade espermática total (MT) por até 240 minutos.

7.11. A adição de antioxidantes (50 µMol/100x10^6 espermatozóides de Trolox® e 50 µg/mL - 0,0935 U/mL de Catalase) ao meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo confere proteção ao acrossomo no transcorrer do teste de exaustão após a refrigeração do sêmen por até 48 horas, nos momentos de 60 minutos e 240 minutos.

8. REFERÊNCIAS

AAMDAL, J.; LYNGSET, O.; FOSSUM, K. Toxic effect of lysolecithin on sperm a preliminary report. **Nordisk Veterinariaer Medicin**, v. 17, p. 633- 634, 1965.

ALBERTINI, R.; ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant proprieties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v.30, n.3, p. 181-188, 1999.

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

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

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine,** v.26, n.7/8, p. 869-880, 1999.

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

AZEVEDO, D.M.M.R.;TONIOLLI, R. Avaliação *in vitro* de sêmen de caprinos do tipo racial Marota diluído em água de coco estabilizada com antibióticos e leite desnatado adicionado de acido 3 - indol-acetico (IAA) **Revista Brasileira Reprodução Animal**.2000;24 (3): p.187-193.

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléicolinoléico e α-lactoalbumina.** Botucatu-SP, 2006. 214p., Tese (doutorado), Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – UNESP.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 68, p. 181-190, 2001.

BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: 14C tracer and product studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1237, p.77-85, 1995.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology,** v. 57, p.1025-1033, 2002.

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, C. R. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 3, p. 361-365, 1998.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M-A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.

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

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a 13 new classification of the bull spermiogram. **Nord. Veterinaermed**, v.25, p.382-391, 14 1973.

BRINSKO, S. P., ROWAN, K. R., VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology,** v. 53, p. 1641-55, 2000.

BUCAK, M.N.; SARIOZKAN,S.; TUNCER,P.B.; ULUTAS,P.A.; AKÇADAG,H.I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters lipid peroxidation and antioxidant activies in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminat Research,** 2009. 81, 90-95.

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

CBRA. **Manual para Exame e Avaliação de Sêmen Animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed., Belo Horizonte: CBRA, 1998, 79p.

CHAUAN, M. S.; ANAND, S.R. Effects of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. **Theriogenology**, New York v. 34; p. 1003-1013, 1990.

CORT, W.M.; SCOTT, J.W.; ARAUJO, M.; MERGENS, W.J.; CANNALONGA, M.A.; OSCADA, M.; HARLEY, H. PARRISH, D.R.; POOL, W.R. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society,** v.52, n.6, p.174-178, 1975.

CORTEEL, J.M. L'Insémination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. **World Rev. Anim. Prod.**, v.9, p.73-99, 1973.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoides de boue conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal effect du glucose. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 14, n. 1B,p. 741-745, 1974.

CORTEEL, J.M. Production, storage and artificial insemination of goat semen. **Management of reproduction in sheep and goats symposium**, Madison, v. 24, n. 25, p. 188-274, 1977.

CORTEEL. J.M.; PAQUINON, M. Preservation of the male gamete (ram, buck, boar). In: **10TH INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND INSEMINATION ARTIFICIAL***,*1984, Illinois. *Proc...*Illinois: 1984, p. 20-27.

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Effects of equilibration periods on the motility of frozen buck semen in raffinose egg yolk glycerol extender. **Indian Journal of Animal Research**, Haryana, v.29, n.2, p.141-144, 1995.

DAVIS, R.O.; ROTHMANN, S.A.; OVERSTREET, M.D. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. **Fertility and Sterility,** V.57, n.3, p.648-653, 1992.

DEKA, B.C., RAO, A.R. Effect of extenders on sperm motility and acrossomal integrity of frozen Buck semen**. Indian Vet. J**. 1985; 62: 414-417.

DEKA BC, RAO, A.R. Effect of cooling time on quality of frozen goat semen. **Indian Vet. J.** 1987; 8 (1):25-27.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G. et al. A field study of the fertility transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, n. 3, p. 291-304, 1984.

DUNNER, S.; IMPASTATO, M.; Effects of amine organic buffers for semen dilution on fertility of does. **Small Ruminant Research.** 1993. 11, 57-64.

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

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

FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras**. V. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES J.F.; CAMPOS C.A.N.; MONTEIRO, A.W.U.; SILVA FILHO A.H.S. Viabilidade do sêmen caprino Saanen diluído em água de coco e resfriado a 4ºC. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 5, p. 31-38, 2002.

FISHER, L.D.; BELLE, G.V. **Biostatistics A Methodology for the health Sciences.** Wiley-Interscience, New York, 991p, 1993.

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

GIBBONS, A.. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus,** 2002, 4:24-32.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology,** v. 59, p. 1241-1255, 2003.

GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnica aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 15-23; 57-65; 111-23, cap. 2, 4 e 7, 2001.

GONZALEZ, C.I.M. **Avaliação "in vitro" e "in vivo" de sêmen ovino (Ovis aries) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes diluidores.** Botucatu, 1996. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

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

HALLIWELL, B e GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999. 936p.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.88, p.343-52, 1990.

HERRERA, J.; TAPIA, A. RESULTADOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CABRAS DE RAZA GRANADINA CON SEMEN REFRIGERADO. ***Producción Ovina y Caprina*** *• 1998 • XXIII: 547-549*

IRITANI, A.J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. In: **SILVER JUBILEE LAB. ANIM. HUSBANDRY KYOTO UNIVERSITY**. 1961, Kyoto. Proc.Kyoto:1961. p.97-104.

KAYSER, J. P.; AMANN, R. P.; SHIDELER, R. K. et al. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 601-614, 1992.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology,** v. 48, p. 1217-27, 1997.

KRZYZOSIAK, J. EVENSON, D.; PITT,C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, v.12, p. 251-261, 2000.

KATKOV, I.I.; KATHOVA, N.; CRITSER, J.K.; MAZUR , P. Mouse spermatozoa in hight concentracions of glycerol. Chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. **Crybiology**, v.37, p.325-338, 1998.

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

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

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

MAIA, M.S.; **Viabilidade Espermática e Geração de Metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no Semen Ovino Criopreservado em Diluidor Aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. Botucatu - SP, 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP.

MAIA, M.S., BICUDO, S.D., AZEVEDO, H.C., SICHERLE, C.C., SOUSA, D.B., RODELLO, L.. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**. 85, 85–90. 2009.

MAIA, M.S. BICUDO,S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009.

MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction**, **Fertility and Development**, v.8, p. 1013-1020, 1996.

MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N.; GIRÃO, E. S.; PIMENTEL, J. C. M. **Caprinos: Princípios básicos para sua exploração.** Teresina: Embrapa-CPAMN/SPI, 1994, p. 63-78.

MELO, C.C.S.; **Conservação de sêmen caprino a 4ºC utilizando ACP-101® com duas concentrações de Aloe Vera ou gema de ovo**. Fortaleza - CE, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará - Faculdade de Veterinária - UECE.

MIES FILHO, A., DUTRA, J., GIRÃO, R.N. Congelação do sêmen ovino na primavera. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, p.27-57, 1982.

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold-shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 291-304, 1992.

MORANI, E.S. **Quantificação dos radicais livres produzidos nas diferentes etapas do processo de criopreservação do sêmen de touros**. 2004. 79p. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analusis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997

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

NUNES, J. F. **Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro dês espermatozoïdes de bouc.** 1982, 45p. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) - Université Paris VI, 1982.

NUNES, J.F.; FELICIANO SILVA, A.E.D.; Tecnologia do semen resfriado em caprinos. **Revista Brasileira Reprodção Animal.** 1984; 8(2), p.121-127.

NUNES J.F. Inseminação artificial em caprinos. IN: GOLSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnias aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela. p. 111-126, 2001.

PAGANINI FILHO, P. **Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37ºC e sob refrigeração.** Botucatu, 1999. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”;

PALOMINO, J.M.; CERVANTES, M.; RODRÍGUEZ, A.; CISNEROS, F.; HUANCA, W.; Efecto de dos dilutores y tiempos de refrigeración sobre la motilidad individual de semen refrigerado de caprinos. **APPA - ALPA** - Cusco, Perú, 2007.

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

REZK, B. M.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DER VIJGHA, W.J.F.; BAST, A. The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1683, p. 16– 21, 2004

RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci**., v.35, n.3, p.305-312, 1982.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I. et al. Viability and fertility of unwashed Murciano-granadiana goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5oC. **Small Ruminant Research,** v.25, n. 2, p.147- 153, 1997.

RODELLO, L.; BICUDO, S.D.; FALLEIROS, M.B.; MONTEIRO, C.D.; SAKASHITA, S.M. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. **Veterinária e Zootecnia**. v.18, n.2 p.239-248, 2011.

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

SAGACH, V.F.; SCROSATI, M.; FIELDING, J.; ROSSONI, G.; GALLI, C.; VISIOLI, F. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage *in vitro* and *ex vivo*: a comparison with vitamin E. **Pharmacological Research**, v.45, n.6, p.435-439, 2002.

SAHNI, K.L. Practical aspect of artificial insemination of goats in India. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987. Brasília. **Proceedings**...Brasília: Embrapa-DTC, p.549-569, 1987.

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

SALVADOR, I.; YÁNIZ, J.; VIUDES DE CASTRO, M.P.; GÓMEZ, E.A.; SILVESTRE, M.A.; Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5ºC. ***Theriogenology.,***v.99, p.974-981, 2006.

SHAMSUDDIN, M.; AMIRI, Y.; BHUIYAN, M.M.U. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. ***Reprod. Dom. Anim.***, v.35, n. 2, p.53-57, 2000.

SIKKA, S.C.; Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**. V.1, p.78-86., 1996.

SIMPLÍCIO, A.A. Inseminação artificial na espécie caprina**. Informativo Agropecuário**., v. 13, n. 148, p. 30, 1987.

SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL,** 1989, Belo Horizonte, MG. *Anais.* BH: CBRA, 1989, p. 171-177.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic of the structure of cell membranes. **Science,** n. 175, p. 720-731, 1972.

SINHA, M.P.;SINHA, A.K.; SINGH B. K.; PRASAD, R. L. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.

SIQUEIRA A.P., SILVA FILHO J.M., FONSECA J.F., BRUSCHI J.H.,PALHARES M.S., BORGES A.M., BRUSCHI M.C.M., PEIXOTO M.P. & ROSSI R. 2009. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5ºC, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., 61:66-71.

SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho";

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

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, n. 3, p. 547–555, 1994.

VERNER D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. et al. Effects of cooling rates storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALMEIDA, A.K.; PORTELA, A.P.M.; BITTENCOURT, R.F.; ALVES, S.G.G.; BITTENCOURT, T.C.C.; QUINTELA, A.T. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**. v.7, n.1, p.67-76, 2006.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen**. Animal Reproduction. Science**., v.60-1, p.481-492, 2000.

9 . TRABALHO CIENTIFÍCO

Trabalho enviado para o periódico Revista **“Veterinária e Zootecnia”**

ISSN: 0102-5716

Normas para publicação disponível em:

http://www.fmvz.unesp.br/revista/port/instrucoes.htm

PARÂMETROS DE MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NO SÊMEN CAPRINO REFRIGERADO EM SISTEMA EQUITAINER®, COM ADIÇÃO OU NÃO DE ANTIOXIDANTES (TROLOX® E CATALASE) AO MEIO DILUIDOR.

Sabrina Missae Sakashita[1]
Sony Dimas Bicudo[2]
Leandro Rodello[1]
Cláudia Dias Monteiro[1]
Letícia Ferrari Crocomo[1]
Marcel Barbosa Falleiros[1]

RESUMO: Avaliou-se o sistema Equitainer® modificado na manutenção da temperatura a 5 ºC por 24 horas e avaliar *in vitro* a integridade de membrana, lesão de acrossomo e cauda do espermatozóide de caprino submetido à refrigeração, utilizando os diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL) com e sem suplementação de antioxidante Trolox® e Catalase (GGL_{tc}).Foram utilizados 2 ejaculados de cada bode da raça Boer (n=6), coletados com vagina artificial e após as análises da integridade de membrana plasmática pela combinação dos corantes fluorescente iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína (PI+CFDA), da patologia espermática em câmara úmida em solução de gluteraldeído a 0,2%, o sêmen foi diluído em cada um dos meios à 32 ºC, para alcançar a concentração de $400x10^6$ espermatozóides/mL. A mistura foi acondicionada em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf®) e submetida à refrigeração em sistema Equitainer® Após 24 horas foram realizadas as análises de integridade de membrana plasmática, de acrossomo e cauda espermáticas, sendo as amostras de sêmen submetidas ao teste de exaustão em banho-maria a 37 ºC e analisadas nos momentos 30, 60, 120 e 240 minutos. O sistema Equitainer® modificado foi capaz de manter adequados padrões de morfologia espermática do sêmen caprino refrigerado a 5 ºC por 24 horas. Os diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL) e Glicina-Gema-Leite aditivado com 50 µMol/$100x10^6$ espermatozóides de Trolox® e 50 µg/mL(0,0935 U/mL) de Catalase; (GGL_{tc}) foram eficientes em manter a viabilidade de parâmetros morfológicos da membrana plasmática, acrossomo e cauda dos espermatozóides, no sêmen caprino refrigerado a 5 ºC por 24 horas. A suplementação de Trolox® e Catalase ao diluidor Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL_{tc}) propiciou melhor viabilidade espermática às 24 horas de armazenamento, e durante o teste de exaustão, resultando em maiores percentuais de acrossomo integro dentre os diluidores testados. Constatou-se que a incubação do sêmen caprino a 37 ^oC por um

período de 240 minutos, após a refrigeração, é excessivamente desafiador aos espermatozóides e sugere-se então a diminuição do tempos máximo a ser empregado no teste de exaustão.

PALAVRAS-CHAVES: antioxidante; sêmen caprino; refrigeração, Equitainer®.

1 - Pós graduandos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Univ Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu, SP, Brasil.
2 – Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Univ Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu, SP, Brasil.
Correspondência: Sabrina Missae Sakashita, Rua João Adolfo 1527, CEP: 18200-353, Centro, Itapetininga-SP, Fone:(15) 97528176 - email: samisavet@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Na tentativa de se determinar substâncias que proporcionem melhores condições para sobrevivência espermática e conseqüentemente melhores índices de fertilidade, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas procurando avaliar a viabilidade do sêmen caprino submetido ou não à criopreservação após a diluição (1).

Por razões práticas, buscam-se aprimorar métodos mais eficientes para a conservação do sêmen em estado líquido, refrigerado ou para superação das dificuldades inerentes ao processo de congelação. O uso do sêmen caprino refrigerado constitui-se em alternativa ao sêmen congelado e seu emprego traria inúmeros benefícios aos sistemas de produção extensivos (2).

A refrigeração do sêmen caprino pode ser feita em temperaturas entre 2 °C e 15 °C, porém, as mais utilizadas encontram-se entre 4 e 5 ºC (3), pois se observa que para os espermatozóides armazenados a 5 ºC, as necessidades metabólicas decrescem à aproximadamente 10% daquelas que teriam se estivessem à 37 ºC (2).

A normalidade funcional das membranas espermáticas é condição essencial para a fertilização e sua avaliação é um importante indicador do potencial fecundante do sêmen (4). Vale ressaltar que dentre as inúmeras condições a serem observadas para o sucesso da inseminação artificial (IA), um dos pré-requisitos indispensáveis é o uso de diluentes capazes de manter a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (5).

Efeitos deletérios resultantes da interação de enzimas presentes no sêmen do bode com constituintes que fazem parte da composição dos diluidores assume grande importância no processo de conservação do sêmen refrigerado ou congelado (6).

Diluidores a base de gema de ovo podem apresentar diversidade de resultados devido às peculiaridades, como heterogeneidade das características de composição da gema de ovo e a variação sazonal na concentração da enzima presentes no plasma seminal (3,7).

O leite desnatado é o constituinte mais freqüentemente utilizado nos diluentes de sêmen caprino visando à inseminação artificial sendo a capacidade fecundante dos espermatozóides mantida por 12 a 24 horas (8,9).

A geração de altas concentrações de ROS (*reactive oxygen species*) no sêmen está associada ao declínio na viabilidade espermática interferindo no metabolismo energético e motilidade, podendo resultar em fragmentação do DNA espermático conforme o observado em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens (10,11,12,13,14).

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações comparadas aquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente sua oxidação. (15).

Objetivou-se avaliar o emprego do sistema Equitainer® modificado na refrigeração do sêmen caprino diluído em meio a base de leite desnatado e gema de ovo aditivado ou não de Trolox® e catalase, sobre aspectos morfológicos da membrana plasmática, acrossomo e cauda dos espermatozóides.

MATERIAL E METÓDOS

Padronização do Sistema Equitainer® após modificações

Devido ao interesse de se acondicionar as amostras em tubos cônicos de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf®), foi necessária a realização de pré-ensaios de calibração e padronização de dois equipamentos Equitainer® (Hamilton Research, Inc. - USA), pela colocação no seu interior (Figura 1) de um coletor universal (CLT80ES-CRAL artigos p/laboratório- Cotia - SP) que serviu como lastro térmico, variando os volumes de água à temperatura inicial de 32 ºC, até que fossem obtidas curvas adequadas à refrigeração e manutenção do sistema à 5 ºC. Utilizou-se termômetro digital de máxima e mínima com termopares interno e externo (TM288 – Equitherm,

São Paulo- SP) que permitiu a aferição simultânea das temperaturas ambiente e do interior do sistema de refrigeração.

Na porção periférica da tampa do coletor universal foram realizadas seis perfurações eqüidistantes e com diâmetros adequados a transpassar por eles seis tubos cônicos de polipropileno (Ependorf®) de tal forma que os tubos permanecessem em contato com a água do interior do coletor (Figura 1). Ao centro uma sétima perfuração foi realizada transpondo-se um tubo cônico e que serviu para abrigar o termopar que registrou a temperatura interna do sistema de refrigeração.

Com esta modificação proposta, foi possível refrigerar simultaneamente as amostras de sêmen provenientes de dois animais e diluídas nos três meios estudados. Para cada ciclo de refrigeração, procedeu-se o encaixe no interior dos dispositivos de 2 latas de refrigeração Equitainer® previamente mantidas em congelador à 20 ºC negativos por no mínimo 24 horas. O sistema contendo as alíquotas permaneceu hermeticamente fechado por todo tempo de refrigeração.

Coleta do sêmen:

Os procedimentos foram realizados no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP- Universidade Estadual Paulista, município de Botucatu, Estado de São Paulo (Lat. 22° 52’ S; Lon. 48° 26’ W), nas instalações do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN).

Foram utilizados, 6 reprodutores caprinos, da raça Boer com idade entre 1 a 4 anos, e pesos entre 45 a 90 kg, com aptidão reprodutiva constada pelo exame clínico-andrológico conforme o Manual do CBRA de 1998 (16). Entre agosto e dezembro de 2010, foram processados 2 ejaculados de cada reprodutor, sendo então realizadas doze coletas pelo método de vagina artificial a temperatura de 42 ^{o}C em com copo coletor graduado pré-aquecido à 37 ^{o}C. Após a coleta, o sêmen foi mantido em banho-maria a 32 ºC até completadas as análises morfofuncionais e concentração espermáticas e a seguir processadas as diluições pré-refrigeração a esta temperatura.

Análise de integridade membranas plasmáticas dos espermatozóides

Para a análise da integridade das membranas plasmáticas dos espermatozóides, foram coletadas alíquotas do sêmen após a diluição na pré-refrigeração, pós-refrigeração por 24 horas e durante o teste de exaustão.

Foi preparada uma solução de trabalho, adicionando a cada mililitro (mL) de solução salina, 20 µL de formaldeído, 20 µL de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e 10 µL de iodeto de propídio (PI) (17).

Para realizar a análise, 50 µL da solução de trabalho foi depositado em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf®), em seguida, acrescida 10 µL de sêmen, mantendo uma concentração final de 10^7 espermatozóides/mL.

Após incubação por no mínimo 8 minutos à temperatura ambiente, 5 µL dessa suspensão foi depositada entre lâmina e lamínula e observado em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Leica DM LB, Germany) com filtro de excitação (BP) 450-490nm, espelho dicromático 510nm e filtro de supressão (LP) 515nm (17). Foram avaliados 100 espermatozóides/lâmina e distribuídos percentualmente (%) nas seguintes classificações: **Íntegros** - acúmulo de CFDA (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de PI (fluorescência vermelha) em nenhum dos compartimentos; e **Lesados** - acúmulo de PI ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de CFDA; acúmulo de CFDA na peça intermediária e acúmulo de PI na cabeça unicamente e acúmulo de fluorescência amarelada na região acrossomal; acúmulo de PI na cabeça e de CFDA na peça intermediária.

Análise da integridade acrossomal e dobramento da cauda espermática

Para a análise da integridade acrossomal e dobramento da cauda espermática, foram coletadas alíquotas do sêmen *in natura* e diluido na pós-refrigeração de 24 horas e durante o teste de exaustão.

Cada alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em 500 µL de solução de gluteraldeído a 0,2% (18). As amostras foram acondicionadas em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL e estocadas à temperatura entre 4 a 5 ºC para posterior leitura.

Para a leitura, foi utilizada a microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x sob imersão em preparações úmidas, colocando uma gota da mistura entre lâmina e lamínula e classificando-se 100 células por preparação, de acordo com Blom (19).

Nas análises dos dados, foram levados em consideração os espermatozóides com acrossomo integro (**%**)(20) e aqueles com cauda dobrada (**%**).

Processamento do sêmen

Após as avaliações do ejaculado, o sêmen foi destinado a três tratamentos de acordo com o meio em que foi diluído:

- GL – Glicose-Leite (21).
- GGL – Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (Osmolaridade: 288 mOsm e pH: 7,2) (22).
- GGL_{tc} – Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (Osmolaridade: 288 mOsm e pH: 7,20 + Trolox® 50 µMol /100x10^6 espermatozóides + Catalase 50 µg/mL. 0,0935 U/mL) (22).

As diluições foram realizadas para se obter concentração de 400x10^6 espermatozóides/mL.

Análise do sêmen pós-refrigeração

Ao término de 24 horas o sistema Equitainer® foi aberto, os microtubos de fundo cônico contendo as alíquotas diluídas nos meios GL, GGL e GGL_{tc}, foram retirados e acondicionados no banho-maria a temperatura de 37 ºC durante 5 minutos, e após homogenização iniciou-se as análises pós-refrigeração. Esta análise também foi considerada como momento inicial do teste de exaustão. Para análise de integridade das membranas plasmáticas dos espermatozóides, 50µL de solução de trabalho em 10µL de amostra e para a análise integridade acrossomal e dobramento da cauda espermática utilizaram 300µL de solução de Gluteraldeído 0,2% para 30µL de amostra. Ao término da análise pós-refrigeração, cada amostra recebeu uma fração do diluidor correspondente (*feeding*), à temperatura de 37 ºC e em volume equivalente ao retirado para a realização das análises (23).

Teste de exaustão

As amostras foram submetidas ao teste de exaustão pela incubação em banho-maria a 37°C durante 240 minutos (24). Foram repetidas as análises de integridade das membranas plasmáticas dos espermatozóides e de integridade acrossomal e dobramento da cauda espermática nos momentos de 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 240

minutos de incubação. Após cada análise, seguiu-se o *feeding* pela adição, em cada uma das alíquotas, de diluidor correspondente, à temperatura de 37 ºC, em volume equivalente ao retirado para a realização das análises (23).

Análise estatística

Como havia interesse em se comparar os tratamentos, os tempos de refrigeração e os momentos de incubação (teste de exaustão), os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com três tratamentos (GL, GGL e GGL_{tc}), tempo de refrigeração (24 horas) e cinco momentos de incubação (0, 30, 60, 120 e 240 minutos).

Para a análise dos dados utilizaram-se às médias dos valores obtidos das duas coletas de cada animal. Foram ainda avaliados a existência de efeito individual dos animais sobre os parâmetros estudados. Como as variáveis apresentaram distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey do programa Biostat® versão 5.0. O nível de significância utilizado foi de 5% (25).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Na dependência da raça, os parâmetros seminais dos caprinos sofrem forte influência das variações circanuais do fotoperíodo nas diferentes latitudes. Como exemplo, em regiões de clima temperado, para as raças Alpinas e Saanen os percentuais mais elevados de patologia espermática são observados nos meses de primavera e verão (26).

O presente estudo foi conduzido no período compreendido entre agosto e dezembro, porém as características seminais dos animais utilizados podem ser comparáveis aos valores relatados para a época mais favorável à reprodução dos caprinos (8, 27, 28). A adequada qualidade do sêmen observada, neste caso, foi atribuída à menor variação qualitativa apresentada por bodes da raça Boer, ao longo das estações do ano em clima tropical (29).

Na Figura 2 está representada a temperaturas médias do ambiente e do interior do sistema Equitainer® obtidas em seis repetições, após a padronização do volume/temperatura ideais de líquido (100 mL de água à 32 ºC) colocado como lastro dentro do copo coletor. O sistema com as modificações elaboradas apresentou como característica a queda de temperatura na razão de 0,2 (na primeira hora) a 0,03 ºC/min

na fase final de resfriamento, consideradas adequadas ao processo de refrigeração do sêmen (8).

Não houve efeito dos valores obtidos (P>0,05) de cada animal individualmente (média da coleta em duplicata) sobre qualquer dos parâmetros em nenhuma das condições experimentais estudadas e devido a isto para a análise dos dados, considerou-se a média obtida em cada momento tendo como causa de variação os diluidores empregados, os efeitos da refrigeração e do tempo de exaustão.

Os dados referentes às médias ± desvio padrão do percentual de integridade da membrana plasmática em microscopia epifluorêscencia, integridade acrossomal e dobramento da cauda espermática no sêmen dos seis reprodutores na pré e pós-refrigeração a 5 ºC por 24 horas, utilizando-se o sistema Equitainer® modificado, e diluido em GL, GGL ou GGL_{tc} são apresentados na Tabela 1 e os valores obtidos durante o teste de exaustão realizado após refrigeração fazem parte da Tabela 2.

A membrana plasmática é fundamental para a função espermática, constituindo-se em uma barreira semi-permeável para determinadas moléculas com a função de manter e modular a composição intracelular (30).

Não houve efeito (P>0,05) do processo de refrigeração por 24 horas em sistema Equitainer® modificado e nem dos meios diluidores empregados, sobre os percentuais de integridade de membrana plasmática determinada pela técnica de combinação de sondas fluorescentes PI/CFDA (Tab.1).

Ao longo do teste de exaustão (Tab.2) a integridade de membrana plasmática dos espermatozóides manteve-se com valores semelhantes, observando-se queda nos percentuais aos 240 minutos de incubação para todos os meios estudados, entretanto, observaram-se diferenças (P<0,05) entre os diluidores apenas na avaliação dos 120 minutos de incubação, sendo que as amostras diluídas em GGL_{tc} (73,3 ± 10,8%) apresentaram valores superiores aos daquelas diluídas em GGL (54,3 ± 26,4%).

Os resultados encontrados neste estudo para integridade de membrana, utilizando sêmen pré e pós-refrigeração de 24 horas e sem remoção do plasma seminal independente do diluidor utilizado, são semelhantes aos relatados para as condições de refrigeração utilizando-se o teste hiposmótico (8).

As lesões da membrana plasmática no processo de preservação do sêmen pela congelação são mais acentuadas que as observadas na refrigeração. Cavalcante (31), estudando a fertilidade de machos caprinos da raça Boer durante as estações

reprodutivas e não reprodutiva, observou percentagens de membranas íntegras, da ordem de 20,33 ±15,03 e 30,01 ±17,57% para o sêmen pós-descongelação.

No macho caprino, as glândulas bulbo-uretrais produzirem a fosfolipase EYCE (*egg yolk coagulation enzyme*) e a fração protéica BUSgp60 que são agregadas ao ejaculado. A EYCE hidrolisa a lecitina presente na gema de ovo que compõem alguns diluentes, formando ácidos graxos e lisolecitinas, sendo que esta última de alto poder lesivo à membrana espermática (32) devido a sua ação detergente sobre os lipídios que a compõem (33). A BUSgp60 hidrolisa os triglicerídeos presentes nos diluentes a base de leite, resultando na produção de ácidos graxos tóxicos aos espermatozóides de caprinos, capazes de inibir sua motilidade, a exemplo do ácido oléico (2, 34).

Ao utilizarem meios a base de gema de ovo na preservação do sêmen caprino, Ritar e Salamon (35) constataram que a integridade da membrana plasmática é mais bem preservada sem a presença do plasma seminal, devido a remoção da fosfolipase EYCE nele contido.

Não obstante, a refrigeração do sêmen ovino induz edema da região anterior do acrossomo (36) que pode ser minimizada pela adição de pelo menos 3% de gema de ovo ao meio. Por outro lado, Roca et al. (3) observaram que os espermatozóides caprinos foram preservados a 5 ºC, por um período de até 36 horas, em meio diluidor contendo apenas 2% de gema de ovo.

A despeito de não ter sido removido o plasma seminal, os dois diluidores contendo em sua composição a gema de ovo mantiveram inalterados os percentuais de membranas funcionalmente integras durante o processo de refrigeração. A presença de gema de ovo, aparentemente também não influenciou negativamente a integridade de membrana plasmática ao longo do teste de exaustão. A quantidade reduzida de gema, na proporção de 5%, pode ter contribuído para minimizar os efeitos tóxicos da interação plasma seminal/meio diluidor durante o processo de refrigeração, e adicionalmente fora da estação reprodutiva, período em que o experimento foi realizado, é esperado menores teores de fosfolipase EYCE no plasma seminal dos bodes (37).

As vantagens da fixação dos espermatozóides bovinos em soluções tamponadas contendo 0,2% de gluteraldeído foram apresentadas por Johnson, et al. (38), que relataram a possibilidade de preservação por longo período das estruturas espermáticas, entre elas o acrossomo, para posterior avaliação. No presente estudo utilizou-se solução fosfatada tamponada com 0,2% de gluteraldeído (18) que se mostrou eficiente na preservação das características morfológicas dos espermatozóides caprino nas

preparações úmidas avaliadas em microscopia de contraste de fase em procedimentos realizados até 48 horas após a fixação.

Há fortes evidências de que a membrana plasmática dos espermatozóides é mais susceptível às alterações durante a criopreservação que a membrana acrossomal (39).

As amostras de sêmen diluídas em GGL e GGL_{tc} apresentaram menores ($P<0,05$) percentuais de lesões do acrossomo (3,5 ±4,2 e 2,6 ±4,1%) após a refrigeração por 24 horas que aquelas diluídas GL sendo que este conferiu menor estabilidade à integridade do acrossomo durante o processo de refrigeração (1,7 ±3,2 *vs* 9,4 ±7,5; $P<0,05$).

Singh e Purbey (40) ao avaliarem a viabilidade espermática "in vitro", após 24 horas de resfriamento a 5 °C, em meio diluidor Tris, com 20% de gema, observaram integridade acrossomal de 82,24%.

Durante o teste de exaustão, as diferenças na incidência de lesão de acrossomo observadas após a refrigeração a favor das amostras diluídas em meio GGL_{tc}, ao serem comparadas com as diluídas em GL mantiveram-se até os 120 minutos de incubação, no entanto as amostras diluídas em GGL apresentaram comportamento intermediário não mantendo as diferenças originalmente detectadas de maneira homogênea ao longo do tempo.

Atribui-se aos antioxidantes Trolox® e catalase, presentes na composição do meio GGL_{tc} um efeito benéfico da proteção à integridade acrossomal durante os processos de refrigeração e exaustão. A adição de antioxidantes ao diluente visa proteger os espermatozóides do efeito dos ROS sobre a lipoperoxidação das membranas (41).

O Trolox® é um antioxidante com moderado poder hidrossolúvel e que pode ser distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídios da membrana espermática sem a necessidade de utilização de solventes, agindo como um excelente protetor contra a lipoperoxidação (42).

A catalase é uma heme-proteína citoplasmática, originalmente localizada nos peroxissomos das células de mamíferos, atua como antioxidante enzimático e catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). Também atua na destoxificação de diferentes substratos (ex. fenóis e alcoóis), via redução do peróxido de hidrogênio (43).

Aalseth e Saacke (44) estudaram os efeitos da incubação do sêmen bovino a 37 ^{o}C, após a refrigeração, sobre a integridade acrossomal e constataram que a alteração do pH durante este processo promove incremento das lesões.

Constata-se que incubação do sêmen do caprino a 37 ^{o}C por um período de 240 minutos, após a refrigeração, é excessivamente desafiador aos espermatozóides, levando-se em conta os meios empregados, em cuja formulações não fazem parte eficientes sistemas tampão.

A normalidade da cauda espermática foi entre todos os parâmetros estudados, o menos influenciado pelo processo de refrigeração e teste de exaustão. Ao longo da incubação após a refrigeração do sêmen por 24 horas, a porcentagem de espermatozóides com cauda dobrada, não diferiu ($P>0,05$) entre as amostras nos três diluidores estudados em nenhum dos momentos até os 240 minutos do teste de exaustão.

A ocorrência de dobramento da cauda dos espermatozóides em condições especiais de osmolaridade e exposição à temperatura pode ser empregada para avaliar a funcionalidade das membranas plasmáticas, antes ou após o processo de criopreservação como a refrigeração (45).

A avaliação “in vitro” do sêmen resfriado a 4 ºC, realizada por Nunes e Silva (1984), evidenciou que, no terceiro dia de armazenamento, a porcentagem de espermatozóides vivos encontrava-se no limite mínimo de sua utilização (30% de motilidade). Porém, com relação às alterações morfológicas, nas primeiras 24 horas de armazenamento, encontravam-se no limite máximo para a utilização do sêmen, que é de 15%.

Períodos mais longos de armazenamento do sêmen resfriado foram relatados por outros pesquisadores, dessa forma, (46), relataram a manutenção da capacidade fecundante dos espermatozóides por oito dias, quando armazenados a 5 ^{o}C, em diluidor de Tris-frutose-gema (2% de gema).

Pomares et al. (47) relataram um período maior de sobrevivência espermática (12 dias), a 5ºC, ao incorporarem antioxidantes ao meio diluidor.

A manutenção da normalidade morfológica das caudas espermáticas durante o processo de refrigeração por 24 horas e ao longo do teste de exaustão refletiu os cuidados tomados na realização do experimento em não se provocar alterações bruscas na temperatura ou na composição osmótica das soluções empregadas, evitando-se a ocorrência dos chamados choques térmico e/ou osmótico.

A incubação do sêmen caprino a uma temperatura de 37 ºC por até 240 minutos, a despeito da reposição do meio diluidor (*feeding*) que objetivou revitalizar a condição do ambiente de incubação, pareceu ser demasiadamente severa. Aos 240 minutos do teste, observaram-se valores muito inferiores para todas as variáveis estudadas sem que isto contribuísse para apontar qual meio se destaca entre os demais, por não consolidar as diferenças já apontadas nos tempos anteriores. Adicionalmente, entre as ultimas análise (120 e 240 minutos) decorreu um tempo de duas horas sem nenhuma renovação na composição do ambiente de incubação. Sugere-se então que menores tempos sejam empregados no teste de exaustão, a exemplo dos 120 minutos indicado por Baril et al. (48) ou os 180 minutos indicados por Henry e Neves (16).

CONCLUSÕES:

As modificações no Sistema Equitainer®, propiciaram um declínio de temperatura adequado ao processo de refrigeração do sêmen caprino e foram capazes de manter com eficiência a temperatura interna do sistema, próximo aos 5 ºC por até 24 horas.

O sistema Equitainer® de refrigeração com as modificações realizadas foi eficiente em manter a viabilidade de parâmetros morfológicos da membrana plasmática, acrossomo e cauda dos espermatozóides, no sêmen caprino refrigerado a 5 ºC por 24 horas.

Os diluidores Glicose-Leite (GL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL) e Glicina-Gema-Leite aditivado com 50 µMol/100x10^6 espermatozóides de Trolox® e 50 µg/mL(0,0935 U/mL) de Catalase; (GGL_{tc}) foram eficientes em manter a viabilidade de parâmetros morfológicos da membrana plasmática, acrossomo e cauda dos espermatozóides, no sêmen caprino refrigerado a 5 ºC por 24 horas,

A suplementação de Trolox® e Catalase ao diluidor Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL_{tc}) propiciou melhor viabilidade espermática às 24 horas de armazenamento, e durante o teste de exaustão, resultou em maiores percentuais de acrossomo integro dentre os diluidores testados.

Constata-se que a incubação do sêmen caprino a 37 ºC por um período de 240 minutos, após a refrigeração, é excessivamente desafiador aos espermatozóides e sugere-se então a diminuição do tempos máximo a ser empregado no teste de exaustão.

REFERÊNCIAS

1. Viana AKS, Chalhoub M, Ribeiro Filho AL, Almeida AK, Portela APM, Bittencourt RF, Alves SGG, Bittencourt TCC, Quintela AT. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. Cien Anim Bras. 2006; 7: 67-76.

2. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim Reprod Sci. 2000; 62:113-41.

3. Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Lafuente A, Vazquez J M.Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5ºC. Small Rumin Res. 1997; 25: 147-53.

4. Melo MVI. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino [tese].Viçosa: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 1999.

5. Moreno FAB, Bispo CAS, Guerra MMP, Tenório Filho F, Oliveira RR, Alves LC,et al. Motilidade, vigor e dosagem de Aspartato Amino Transferase no sêmen caprino diluído em leite desnatado e Fiser. Rev Bras Reprod Animal. 2001; 25:460-2.

6. Simplício AA, Machado R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: Congresso Brasileiro De Reprodução Animal; 1989, Belo Horizonte. Belo Horizonte: CBRA.1989:171-7.

7. Corteel JM. L'Insémination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. World Rev Anim Prod.1973;9:73-99.

8. Bispo CAS. Avaliação "in vitro" do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores [dissertação].Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2005.

9. Leboeuf B, Guillouet PH, Batellier F, Bernelas D, Bonné JL, Forgerit Y, et al. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. Theriogenology. 2003; 60: 867-77.

10. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free radical biology & medicine. 1999;26 (7/8):869-80.

11. Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Fertil Steril. 2000;74:1200-7.

12. Krzyzosiak J, Evenson D, Pitt C, Jost L, Molan P, Vishwanath R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. Reprod Fertil Dev. 2000;12:251-61.

13. Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. Theriogenology. 2002; 57:1025-33.

14. Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirad MA. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by

pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology. 2002; 57:1105-22.

15. Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. Rev Bras Reprod Anim. 2009;33(4):183-93.

16. Henry M, Neves JP. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen Animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - Cbra, 1998 :49.

17. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J Reprod Fertil. 1990;88:343-52.

18. Barth A D, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press. 1989; 285.

19. Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a 13 new classification of the bull spermiogram. Nord. Veterinaermed. 1973;25:382-91.

20. Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J An Sci. 1972;34:278-83.

21. Corteel, J.M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal. Effect du glucose. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique.Paris.1974;14(4B):741-5.

22. Rodello L, Bicudo SD, Falleiros MB, Monteiro CD, Sakashita SM. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. Vet Zootec. 2011;18:239-48.

23. Sousa DB. Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.

24. Paganini Filho P. Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37ºC e sob refrigeração [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1999.

25. Fisher LD, Belle GV. Biostatistics A Methodology for the health Sciences. New York: Wiley-Interscience,1993.

26. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. Small Rumin Res.1992 ; 9:47-59.

27. Betini CM, Moraes GV, Rigolon CR. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. Acta Scientiarum. 1998; 20(3): 361-5.

28. Azerêdo GA, Esper CR, Resende KT. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. Small Rumin Res. 2001; 41:257-63.

29. Greyling JPC, Grobbelaar JAN. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. South African Journal Animal Science. 1983;13:250-2.

30. Batista AM, Guerra MMP. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. Rev Bras Reprod An.2010;34:125-32.

31. Cavalcante TV. Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos das raças boer e alpina durante as estações, reprodutiva e não reprodutiva [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.

32. Roy A. Egg yolk-coagulation enzyme in the semen and Cowper´s gland of the goat. Nature.1957;179: 318-19.

33. Nunes JF. Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro dês espermatozoïdes de bouc [tese]. Université Paris VI; 1982.

34. Corteel JM, Paquinon M. Preservation of the male gamete (ram, buck, boar). In: 10th International Congress Animal Reproduction And Insemination Artificial;1984, Illinois. Illinois; 1984. p.20-27.

35. Ritar, A. J., Salamon, S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. Small Rumin Res. Lennoxville; 1991;4:29-37.

36. Jones, R.C.; Martin, I.C.A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastruture of ram spermatozoa. J Reprod Fertil.1973;35:311-20.

37. Iritani, A.; Nishikawa, Y.; Nagasawa, S. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. Jap J Anim Reproduction.1964;10:52-6.

38. Johnson L, Berndtson WE, Pickett BW. An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa. J Animal Sci.1976;42:951-4.

39. Valcárcel A, Heras MA, De Las, Pérez L, Moses DF, Baldassarre H. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. An Reprod Sci.1997;45:299-09.

40. Singh LP, Purbey LN. Preservability of goat spermatozoa in Tris and Citrate extenders at -196°C and 5°C. Indian J. Anim. Sci.1996;66:1139-41.

41. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3ed., oxford university press: NEW YORK. 1999;93:6.

42. Barclay LRC, Artz JD, Mowat JJ. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ^{14}C tracer and product studies. Biochimic et Biophysica Acta. 1995;1237:77-85.

43. Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, Sousa DB, Rodello L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. Small Rumin Res. 2009 ;85:85-90.

44. Aalseth, E.P.; Saacke, R.G. Alteration of the anterior acrossome of motile bovine spermatozooa by frutose and hydrogen ion concentration. J Reprod Fertil.1987;81:625-34.

45. Bittencourt RF, Ribeiro Filho AR, Santos ADF, Chalhoub M, Alves SGG, Vasconcelos MF, et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. Cien An Bras. 2005;6:213-8.

46. Eppleston J, Pomares CC, Stojanov T, Maxwell WMC. In vitro and in vivo fertility of liquid stored goat spermatozoa. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 1994; 26:111(Abstract).

47. Pomares CC, Stojanov T, Eppleston J, Maxwell WMC. Effect of glutathione peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. In: 7º Int Symp on Spermatology; 1994, Cairns.Cairns:1994; 9: (abstract nº24).

48. Baril G, Chemineau P, Cognié Y, Guérin Y, Leboeuf B, Orgeur P, et al. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. FAO. Rome. 1993 :111.

Tabela 1: Médias ± desvio padrão de parâmetros morfológicos da membrana plasmática, acrossomo e cauda dos espermatozóides, no sêmen caprino antes e após refrigeração de 24 horas à 5 ^{o}C, em Sistema Equitainer® modificado, diluído em Glicose-Leite (GL), Glicina Gema Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGLtc).

Diluidor	Pré - Refrigeração	Refrigeração 24 horas
Integridade de membrana plasmática (%)		
GL	71,5±13,7	74,7±10,8
GGL	70,0±11,8	67,1±16,8
GGL_{tc}	73,8± 8,8	68,1±13,6
Acrossomo Lesado*(%)		
GL	$1,7±3,2^{b}$	$9,4±7,5^{aA}$
GGL	1,7±3,2	$3,5±4,2^{B}$
GGL_{tc}	1,7±3,2	$2,6±4,1^{B}$
Cauda dobrada* (%)		
GL	5,2±4,2	8,7±4,8
GGL	5,2±4,2	6,5±6,6
GGL_{tc}	5,2±4,2	6,6±4,6

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a P< 0,05 pelo teste de Tukey.
Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a P< 0,05 pelo teste de Tukey.
* dados utilizados referentes ao sêmen *in natura*.

Tabela 2: Médias ± desvio padrão de parâmetros morfológicos da membrana plasmática, acrossomo e cauda dos espermatozóides, no sêmen caprino durante o Teste de Exaustão pós-refrigeração de 24 horas à 5 °C, em Sistema Equitainer® modificado, diluído em Glicose-Leite (GL), Glicina Gema Leite com 5% de gema de ovo (GGL), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com antioxidante Trolox® e Catalase (GGLtc).

Diluidor	**Pós - refrigeração 24 horas**				
	0	**30**	**60**	**120**	**240**
Integridade de Membrana Plasmática (%)					
GL	74,7±10,8^{a}	68,5±13,0^{a}	59,6±19,1^{ab}	57,5±14,7^{abAB}	43,7±24,4^{b}
GGL	67,1±16,8^{a}	58,5±25,5^{ab}	55,6±25,7^{ab}	54,3±26,4^{abB}	32,5±30,6^{b}
GGLtc	68,1±13,6^{ab}	69,0±9,5^{ab}	70,5±9,5^{ab}	73,3±10,8^{aA}	49,1±37,5^{b}
Acrossomo Lesado (%)					
GL	9,4±7,5^{bA}	14,0±10,3^{abA}	22,6±14,1^{abA}	23,1±12,5^{abA}	24,0±26,6^{a}
GGL	3,5±4,2^{bB}	8,1±6,4^{bAB}	7,1±8,4^{bB}	17,3±19,2^{abAB}	33,1±38,6^{a}
GGL_{tc}	2,6±4,1^{bB}	5,0±4,0^{bB}	5,1±4,5^{bB}	6,4±4,7^{bB}	36,7±36,9^{a}
Cauda Dobrada (%)					
GL	8,7±4,8	9,5±7,8	6,5±5,8	6,5±6,2	15,1±26,8
GGL	6,5±6,6	7,0±4,4	9,1±4,1	8,9±9,1	21,2±34,9
GGL_{tc}	6,6±4,6	5,2±4	8,5±4,2	8,9±4,8	6,5±4,8

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a P< 0,05 pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a P< 0,05 pelo teste de Tukey.

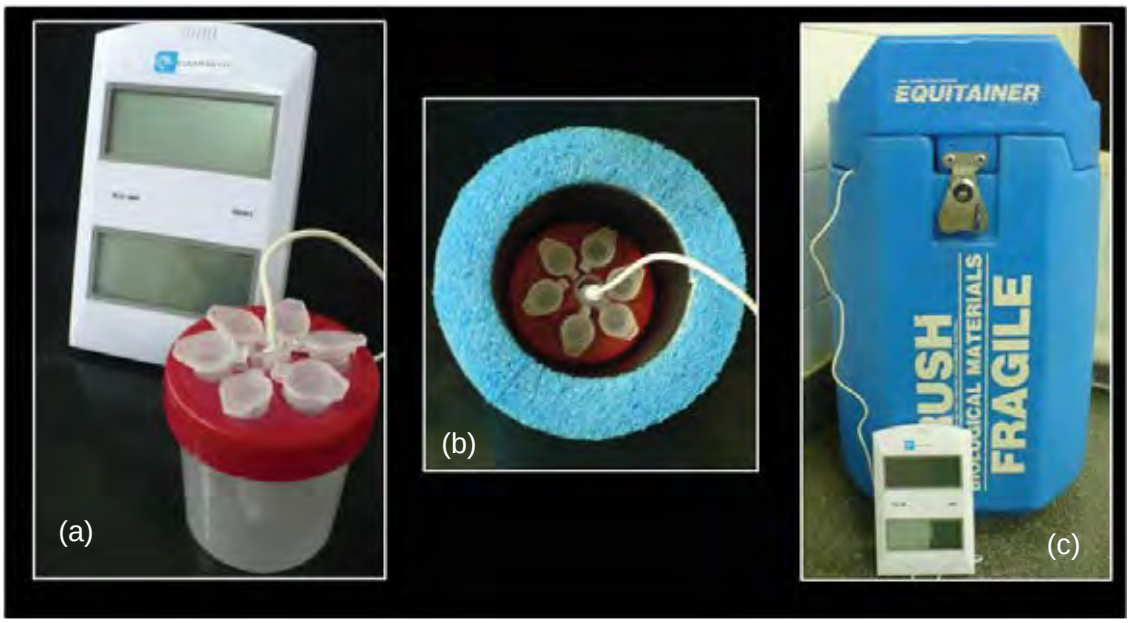

Figura 1 – componentes do interior do Sistema Equitainer® modificado. **(a)** termômetro com coletor universal e microtubos cônicos **(b)** coletor universal com microtubos cônicos e termômetro, no interior do isolante Equitainer® **(c)** sistema Equitainer®

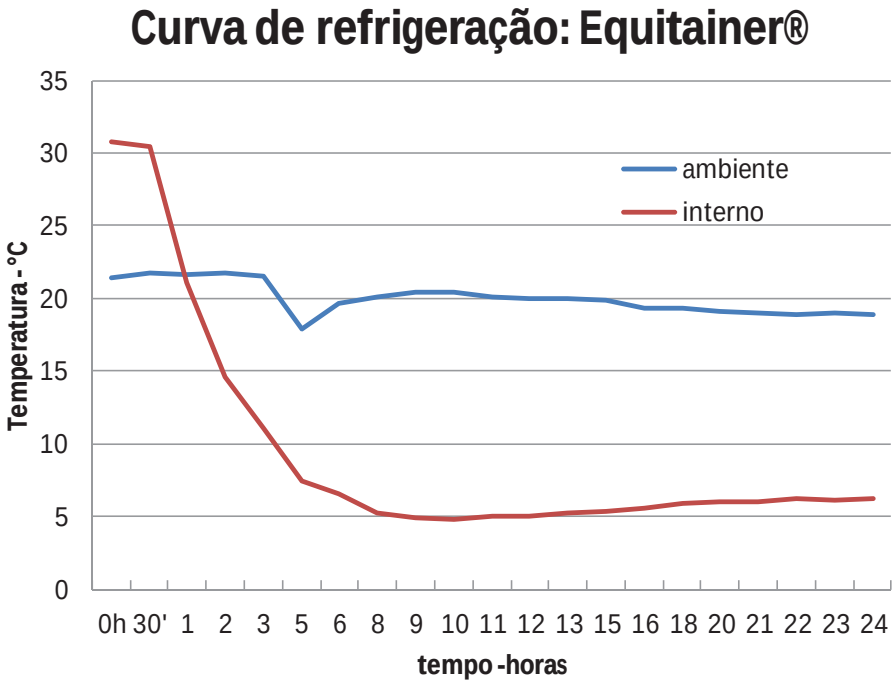

Figura 2 – Registro de 24 horas de observação das temperaturas médias do ambiente e do interior do Sistema Equitainer® modificado, obtidas em ensaios (n=6) após padronização.

10. ANEXO I

10.1. MEIO PARA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN

10.1.1. GGL - Glicina Gema Leite 5% (Gonzalez,1996 modificado por Rodello et al., 2011)

INGREDIENTES	
Solução A	**GGL 5%**
Glicina	1,4g
Citrato de sódio	2,97g
Água destilada	100 mL
Solução B	
Frutose	3,0g
Água destilada	100 mL
Solução A+B	
Amicacina	0,04g
Meio I	
Solução A+B	75 mL
Gema de ovo	5 mL
Orvus es Paste - OEP – Procter & Gambler	0,4mL
Leite desnatado 11% - La Sereníssima® (1,650g em 13,350ml água destilada)	15mL
Água destilada	4,6mL

10.1.2. GL - GLICOSE LEITE (CORTEEL, 1973 apud Sousa, 2002)

INGREDIENTES	GL
Leite desnatado - Molico	10 g
Glicose – Merck KGaA (artigo 1064481000)	0,194 g
Penicilina G Potássica – Lab. Tento Brasileiro Ltda.	0,132 g
Dihidroestreptomicina – Farmavet Ltda.	0,4 g
Água deionizada e destilada	**100 mL**

10.2. ANTIOXIDANTES: TROLOX® e CATALASE - (MAIA et al., 2009).

Trolox®	50µMol/100x10^6 espermatozóides
Catalase	50µg/mL (0,0935 U/mL)

Armazenada a -20ºC

10.3. SOLUÇÂO DE XCell® (IMV Thechnologies (IMV), França). (AZEVEDO, 2006)

Ingredientes	quantidades
Glucose anidra	76,6g
Citrato de sódio bi-hidratado	14,3g
Bicarbonato de sódio	2,6g
EDTA	8,6g
Cloreto de Potássio	2,5g
Sulfato de Gentamicina	0,4g
Solução de Xcell	
Xcell	43,4 g
Água miliQ (qsp)	1000,0mL

Obs.: - *pH e Osmolaridade da em torno de 6,89 e 274 mOsm/Kg respectivamente;*
- *armazenar a 5ºC*

10.4. SOLUÇÃO DE GLUTERALDEÍDO a 0,2% (Barth & Oko, 1989)

Solução de Gluteraldeído a 0,2%	
Solução gluteraldeído a 50% (vetec 50805)	0,4mL
PBS (qsp)	100mL

Armazenar a 5ºC

10.5. SONDAS FLUORESCENTES:

DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCEINA E IODETO DE PROPIDIO (HARRISON e VICKERS, 1990)

SOLUÇÃO ESTOQUE	
SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO (2,5mg/mL)	
Formaldeído a 37% - Vetec	10µL
Água destilada	1500µL
Armazenar entre 4ºC a 8ºC por no máximo 4 dias	
SOLUÇÃO DE DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCEINA (DIC)	
Diacetato de carboxifluoresceina - Sigma, P4170	0,46mg
DMSO – Sigma, D2650	1mL
Após o preparo armazenar protegido da luz a -20ºC	
SOLUÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO (IP)	
Iodeto de propídio – Sigma-Aldrich,28,707,5	0,5mg
Solução salina isotônica	1mL
Após o preparo armazenar protegido da luz a -20ºC	
SOLUÇÃO DE TRABALHO	
Solução Salina	1mL
Solução de formaldeído	20µL
Solução de DIC	20µL
Solução de IP	10µL

10.6. "HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12.3"

ANALYSIS SETUP-GOAT		
IMAGE CAPTURE		
Frames Per sec.	60Hz	
No. of Frames	45	
CELL DETECTION		
Minimum Constrast	70	
Minimum Cell Size	5 pix	
DEFAULTS (if < 5 Motile Cells)		
Cell Size	10 pix	
Cell Intensity	80	
PROGRESSIVE CELLS		
Path Velocithy (VAP)	50,0 µ/s	
Straightness (STR)	80,0%	
SLOW CELLS		
Slow Cells	Motile	
VAP Cutoff	20,0 µ/s	
VSL Cutoff	5,0 µ/s	
STATISTIC GATES (on QC Plots)		
MINIMUM		**MAXIMUM**
0,20	**Static intensity gates**	1,79
0,60	**Static size gates**	1,86
7	**Static elongation gates**	91
CALIBRATION		
Magnification	1,89	
VIDEO SOURCE		
Frequency	60 Hz	
Field	Dark	
ILUMINATION		
Intensity	2136	
Photometer	Low	82
	High	125
ANALYSIS CHAMBER		
Chamber type	Makler	
Chamber depth	10,0 µm	
Stage position	16,3 mm	
Field selection	Automatic	
Set stage temperature	37ºC	