

## Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino

*Andrologic evaluation and technology of caprine semen*

Maurício Barbosa Salviano<sup>1,3</sup>; José Adalmir Torres de Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: mbsalviano@hotmail.com

### Resumo

A criação de caprinos vem tornando-se, mundialmente, uma atividade de alta lucratividade sendo o manejo reprodutivo de fundamental importância para o bom andamento desta atividade. Um reprodutor infértil rapidamente é identificado, porém, aquele que é sub-fértil pode ocasionar uma queda de eficiência dos programas de inseminação artificial e pode causar perdas econômicas consideráveis mesmo quando usado em programas de monta natural. Portanto em uma propriedade que deseja alcançar bons resultados é indicado e necessário um adequado acompanhamento da saúde reprodutiva dos machos. É objetivo desta revisão discutir os parâmetros reprodutivos de caprinos machos, além de enfatizar aspectos da criopreservação de espermatozoides desta espécie.

**Palavras-chave:** andrologia, sêmen, inseminação artificial, caprinos.

### Abstract

*Caprine breeding has becoming, world-wide, a high profitable activity, with great importance on reproductive management. The infertile buck is quickly identified, but the sub-fertile one can provoke a drop in the efficiency of artificial insemination programs and be the cause of economical losses under natural breeding management. Therefore breeding soundness evaluation of the bucks is a requirement to reach good breeding efficiency. The aims of this work were to review reproductive parameters of bucks and, in addition, to focus on some aspects of spermatozoa cryopreservation.*

**Keywords:** andrology, artificial insemination, semen, caprine.

### Introdução

A caprinocultura está apresentando um ciclo de crescimento mundial. Este crescimento se intensificou nas últimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, atualmente detentores dos maiores rebanhos. Acompanhando esta tendência mundial, projeta-se uma multiplicação da ordem de cinco vezes o rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos. Serão mais de 50 milhões de cabeças de caprinos. Dentro desta perspectiva, haverá ampla necessidade de se assistir a reprodução destes animais, seja para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, ou para a multiplicação mais eficiente dos genótipos (Fonseca, 2005).

Em zona temperada, a espécie caprina se comporta como poliéstrica estacional, basicamente, devido ao fotoperíodo. Nos períodos em que há a diminuição da duração de luz, nota-se um início de atividade ovariana, de modo que suas crias nascem durante a época mais favorável do ano – a primavera (Mies Filho, 1987; Hafez e Hafez, 2004). No Nordeste brasileiro, segundo Nunes *et al.* (1997), esses animais assumem a condição de poliéstricos contínuos, em que se observa, todavia, uma determinada estacionalidade produtiva que depende de uma série de variáveis de ordem extrínseca (fotoperíodo, latitude, temperatura e alimentação) e/ou intrínseca (raça, peso, idade). Este fato é bastante evidenciado nas fêmeas desta espécie, no entanto o macho também sobre influência de tais fatores (Cunha, 2006; Machado Júnior, 2006).

A elevação da temperatura ambiental provoca um aquecimento dos testículos, conseqüentemente, um aumento do metabolismo e da demanda de oxigênio pelas células, porém seu fluxo sanguíneo é limitado, tornando-se incapaz de suprir essa demanda, resultando, portanto, em hipóxia seguida de degeneração seminal (Moore, 1924; Philips e McKenzie, 1934; Villares, 1976; Vogler *et al.*, 1991; Setchell, 1998), redução na fertilidade do macho (Gunn *et al.*, 1942; Hulet *et al.*, 1956), alterações na síntese de proteínas e expressão de genes nas células germinativas e de Sertoli (Guo *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 2000).

Nos mamíferos, com testículos localizados permanentemente na bolsa escrotal, a temperatura intratesticular é regulada por mecanismos que agem em conjunto, denominados mecanismos de termorregulação. Os principais mecanismos estão relacionados: as glândulas apócrinas, situadas na bolsa escrotal, que permitem a sudorese com subsequente resfriamento dos envoltórios dos testículos; a túnica dartus e o músculo cremaster que

favorecem o afastamento e a aproximação dos testículos à região inguino-abdominal e o plexo pampiniforme, constituído por artérias e veias testiculares, dispostas contiguamente, o qual é responsável pela troca de calor e consequente resfriamento do sangue arterial (Villares, 1976).

Em regiões áridas e semiáridas, uma particularidade dos caprinos adaptados, observada pela primeira vez por Robertshaw (1982), foi a bipartição do escroto. Essa característica aumenta a superfície de troca de calor com o meio, auxiliando mecanismo termorregulatório no controle da temperatura intratesticular.

Nunes *et al.* (1983), ao analisarem caprinos nativos da raça Moxotó, observaram que animais com escrotos bipartidos apresentaram espermatozoides mais termorresistentes, menor número de patologia e maior motilidade progressiva individual.

Quanto à vascularização dos testículos, Almeida (2003) observou que caprinos com bipartição escrotal que se estendia acima de 50% do comprimento testicular apresentavam um maior número de ramos terminais das artérias testiculares quando comparados aos animais sem bipartição ou com bipartição abaixo de 50% do comprimento testicular. Isto é provavelmente devido à maior extensão da área desta região, o que não significa dizer que este grupo apresenta maior irrigação, mas sim, melhor distribuição.

Segundo Machado Júnior (2006), a biometria escroto-testicular e o comportamento sexual de reprodutores caprinos com bipartição escrotal acima de 50% do comprimento testicular apresentaram maiores valores em comparação aos animais de bolsa escrotal sem bipartição. Esses parâmetros foram melhores na estação chuvosa do que na seca provavelmente devido à maior disponibilidade de alimento de qualidade e maior conforto térmico.

Ao analisar o nível de testosterona plasmática e a porcentagem de espermatozoides com cromossomos X ou Y, Silva (2006) demonstrou pela técnica de hibridização *in situ* que quanto maior a bipartição escrotal, maior a proporção de gametas Y e maior concentração de testosterona plasmática, no entanto não houve correlação entre as características estudadas.

Salviano *et al.* (2006) demonstraram não haver influência da bipartição sobre a integridade da cromatina espermática de caprinos sem raça definida. O turbilhonamento, o vigor e a concentração espermática variaram entre os grupos e foram melhores nos animais com bipartição acima de 50% do comprimento testicular.

### Avaliação andrológica de caprinos

Um reprodutor infértil rapidamente é identificado, porém aqueles com subfertilidade apresentam sérios problemas e ocasionam perdas econômicas para os criadores e para os programas de inseminação artificial, daí a necessidade de um adequado acompanhamento dos reprodutores de uma propriedade (Hafez e Hafez, 2004). O exame andrológico é um dos procedimentos mais utilizados para avaliar o possível potencial de fertilidade de um animal (Salvador *et al.*, 2002). A avaliação da aptidão reprodutiva de um macho destinado à reprodução fundamenta-se na observação da saúde geral, saúde hereditária, saúde genital, *potentia coeundi* e *potentia generandi* (Manual ..., 1998).

Para a padronização do laudo andrológico, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal determina um roteiro base: a identificação detalhada do animal, do proprietário e da propriedade; exame clínico do animal composto de anamnese, exame geral e do sistema genital (interno e externo), comportamento (libido); espermograma (método de colheita, características físicas e morfológicas do sêmen), diagnóstico e/ou conclusão.

Todo reprodutor submetido a uma avaliação andrológica, com vistas ao seu aproveitamento, deve ser classificado em *apto*, *questionável* ou *inapto* (temporário ou permanente).

Dependendo da suspeita clínica de subfertilidade, faz-se necessária uma segunda e até uma terceira avaliação andrológica; para isso, é interessante comentar que o ciclo espermatogênico dos caprinos tem em média de 50 a 53 dias (Swenson e Reece, 1996; Hafez e Hafez, 2004).

#### Avaliação clínica

Durante a avaliação de um reprodutor, é necessário e indispensável fazer a anamnese ou história clínica do animal, ou seja, analisar o regime de atividade sexual do animal: monta natural ou doador de sêmen; frequência de ejaculação; número de coberturas; índice de retorno ao cio; condições de manejo e alimentação; situação sanitária e reprodutiva do rebanho.

Ao realizar o exame clínico geral, o técnico, por meio de observações e inspeções, em estação e em movimento, deve avaliar toda a condição corpórea do animal (sistema nervoso, respiratório, digestivo e locomotor), dando ênfase às condições de apurmos, articulações e cascos, assim como, ao estado nutricional (Manual ..., 1998).

Para a avaliação dos órgãos do sistema genital, utiliza-se observação, inspeção e palpação, podendo ser complementada com auxílio da ultrassonografia. Devem-se analisar, nesta fase do exame, presença e posição dos órgãos, bem como dimensão, consistência, simetria e mobilidade (Radostits *et al.*, 2002). Uma importante observação que deve ser realizada é a correlação entre a idade e os achados da avaliação.

Com o animal em estação, avalia-se a condição do escroto e seu conteúdo, considerando as condições da pele, existência de lesões (ectoparasitas, verrugas, ferimentos, cicatrizes, abscessos), mobilidade, sensibilidade, espessura, temperatura e aderências (Manual ..., 1998).

Para a adequada avaliação testicular, os testículos devem ser imobilizados, um ao lado do outro, levemente tracionados junto ao escroto distendido. Devem ser consideradas as seguintes características: forma, simetria (devem ser simétricos quanto ao tamanho e à forma), consistência (deve ser tensa-elástica, com variações desde flácida até firme), mobilidade (considerando-se a túnica vaginal, devem se apresentar livres dentro do limite fisiológico do escroto), sensibilidade (não devem apresentar sinais de dor ao toque ou a leve pressão), temperatura (fisiologicamente inferior à corporal), posição, tamanho e biometria testicular (Manual ..., 1998).

A aferição do tamanho testicular pode ser considerada sob dois aspectos: na seleção de indivíduos de maior volume testicular e no diagnóstico de alterações. As medidas que devem constar no laudo andrológico são: perímetro e/ou largura escrotal, comprimento (excluindo o epidídimo), largura e espessura (altura) testicular direita e esquerda.

Os epidídimos, constituídos por *cabeça*, *corpo* e *cauda*, estão ajustados aos testículos pelo mesoepidídimo e ligamento testicular próprio. Para avaliação deste complexo, são aplicados os mesmos parâmetros da avaliação testicular, resguardados os aspectos de forma, tamanho e posição, característica.

O exame do funículo espermático é restrito a cada espécie, devido à conformação genital e sua proximidade com a parede abdominal. No caso da espécie caprina, pode-se analisar a consistência e seu grau de distensão, sendo importante lembrar que a distensão está ligada à temperatura ambiente a que o animal é exposto (Hafez e Hafez, 2004).

Algumas patologias podem ser detectadas com a simples palpação do funículo espermático ou a utilização de ultrassonografia, dentre elas destaca-se varicocele, cistos ou processos inflamatórios (Pugh, 2005).

A avaliação prepucial é feita lateralmente, considerando-se a situação da pele e o tecido subcutâneo quanto à presença de aumentos de volume, de temperatura, à existência de ferimentos ou cicatrizes. O óstio prepucial deverá permitir a passagem livre do pênis, e a mucosa deverá ser criteriosamente examinada (Manual..., 1998).

O pênis deve ser examinado em repouso (retraído no prepúcio) e exposto (após excitação sexual); devem ser verificados tamanho, mobilidade, mucosa, secreções e presença de anormalidades.

Existem ainda os órgãos pouco acessíveis; no caso dos caprinos e outros pequenos animais, estes órgãos são: ampolas dos canais deferentes, glândulas vesiculares, próstata e bulbo uretral. Normalmente estes órgãos nos caprinos só são avaliados por ultrassonografia (Pugh, 2005), embora a palpação também possa ser empregada, com o objetivo de se analisar presença, tamanho, posição e consistência (Manual ..., 1998).

#### *Avaliação comportamental (libido)*

Para caprinos, pouco se tem estudado acerca do seu comportamento sexual e menos ainda quanto à avaliação da libido. Normalmente a abordagem da libido dos caprinos é baseada adaptando-se a avaliação do comportamento dos bovinos. Alguns autores (Freitas e Nunes, 1992; Machado Júnior, 2006; Silva, 2006) adotaram a metodologia considerando o tempo de aproximação e monta, classificando os reprodutores como Excelente (tempo entre 0 a 59 segundos), Bom (entre 60 e 120 segundos) e Regular (superior a 120 segundos).

Machado *et al.* (1994) encontraram vantagens quanto ao número de montas realizadas por bodes Moxotó em comparação aos da raça Pardo-Alpina. Santos (2003) verificou influências da raça sobre a libido de bodes exóticos e aqueles acostumados ao clima semiárido. Santos *et al.* (2005) compararam quatro raças diferentes, Boer, Anglonubiana, Pardo-Sertaneja e Moxotó, e observaram que caprinos com aptidão leiteira (Anglonubiana e Pardo-Sertaneja) têm maior libido, seguindo o mesmo padrão dos bovinos (de corte e leiteiro).

#### *Espermograma*

Cada espécie tem um método de colheita de eleição. Para os caprinos, existem os métodos de vagina artificial, eletroejaculação e o método do coletor vaginal. O método da vagina artificial conjugado com o manequim ou uma fêmea (em cio ou não) é o mais empregado e o que obtém características as mais próximas da real característica do sêmen (Mies Filho, 1987).

Segundo a avaliação convencional do ejaculado (Manual ..., 1998), para as diversas espécies, observam-se as características físicas (volume, aspecto, turbilhão ou movimento de massa, motilidade total e motilidade progressiva individual, vigor e concentração), a morfologia do espermatozoide e seus defeitos (maiores e menores).

O volume é expresso em mililitros (mL) e é bastante suscetível às variações, dependendo do método de colheita, da espécie animal, do regime de serviços anterior à colheita, tempo de excitação, entre outros. Para caprinos, o volume do ejaculado varia de 0,2 a 2,0 mL tendo como média 0,8 mL (Morrow, 1986; Mies Filho, 1987; Hafez e Hafez, 2004).

O aspecto é a avaliação macroscópica do ejaculado; normalmente são avaliadas a cor e a aparência. Estes parâmetros dependem fundamentalmente da concentração de espermatozoides e eventualmente da presença de sangue, pus, urina, células epiteliais, detritos, etc. (Manual ..., 1998). Segundo Mies Filho (1987), o sêmen dos animais pode apresentar-se com aspecto cremoso (com variações desde o cremoso espesso ao cremoso fino), leitoso, opalescente ou soroso e aquoso. Segundo este autor, à simples vista, pode-se efetuar a valoração do ejaculado, de forma empírica, quanto à sua riqueza em espermatozoides. Hafez e Hafez (2004) afirmaram que o sêmen do bode tem coloração que varia de branca acinzentada a amarela.

O turbilhão ou movimento de massa é o movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen *in natura*. A intensidade do movimento é resultante da interação da motilidade, do vigor e da concentração espermática (Manual ..., 1998).

Segundo os métodos convencionais, propostos pelo CBRA, para se proceder à avaliação desta característica, coloca-se uma gota de sêmen sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C e leva-se ao microscópio, como aumento de 100 a 200X.

Historicamente, o turbilhão era observado macroscopicamente colocando-se o tubo contendo sêmen contra a luz; a simbologia utilizada até então era: quatro cruzes para turbilhões muito ativos, três cruzes para turbilhões ativos, duas cruzes para turbilhões lentos e um sinal negativo para a ausência de turbilhões (Mies Filho, 1987).

Atualmente a interpretação, ainda subjetiva, é expressa utilizando-se uma classificação em escala de 0 a 5, em que 0 é a ausência de turbilhão (isso não implica ausência de motilidade) e 5 o valor máximo dado a um acentuado movimento de massa (Manual ..., 1998).

Quando o ejaculado é completo e dentro dos limites fisiológicos, o turbilhonamento é observado somente nos ruminantes (sêmen *in natura*) e é afetado por fatores extrínsecos, como método de colheita, condições de preservação, temperatura da amostra, modo de colocação da amostra na lâmina (Manual ..., 1998).

A motilidade é expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozoides que apresentam motilidade, ou seja, o valor deverá expressar a porcentagem total de espermatozoides móveis. Segundo Mies Filho (1987), esta é uma das principais características que devem ser levadas em conta no exame de um sêmen, para avaliação de sua capacidade fecundante.

Os movimentos dos espermatozoides não obedecem a um padrão único: há elementos que se deslocam para frente em linha reta (movimento progressivo), outros que descrevem uma circunferência (movimento circular) e outros, ainda, se limitam a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório ou local). Quando a porcentagem desses espermatozoides móveis não representar a proporção de espermatozoides com motilidade progressiva, os valores de motilidade deverão ser expressos separadamente como motilidade total e progressiva individual (Manual ..., 1998).

Este exame é realizado em microscópio, preferencialmente binocular, com aumento de 200 a 400X, utilizando-se lâmina coberta por lamínula, previamente aquecidas e mantidas a 37°C durante a avaliação. Normalmente, no caso de ruminantes, faz-se se uma diluição para melhor avaliação, embora algumas espécies, por exemplo, suínos e equinos, não precisem de diluição, ou seja, utilização de extensores (diluidores) previamente aquecidos (por exemplo, solução de citrato de sódio a 2,94%, ringer-lactato, soro fisiológico). Esta ainda é a avaliação mais rotineira, embora existam novas tecnologias, como a fotomicrografia sequenciada ou a avaliação computadorizada (CASA).

O vigor é a característica que representa a força do movimento, que acaba influenciando a velocidade com que os espermatozoides se movimentam. Esta é classificada em escala de 0 a 5, em que 0 é a ausência de movimento progressivo com o deslocamento lateral de cauda fraco e inexpressivo e 5 resulta em movimento vigoroso e veloz dos espermatozoides, geralmente progressivo (Manual ..., 1998).

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por milímetro cúbico (mm<sup>3</sup>) ou centímetro cúbico (cm<sup>3</sup> = mL). O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células no hemocítmetro, ou como é mais conhecida: Câmara de Neubauer, embora também se possa utilizar a espectrofotometria e o *Micro-cell-couter*. Esta característica deverá vir expressa no laudo também na forma de números totais de espermatozoides por ejaculado (Mies Filho, 1987; Manual ..., 1998; Hafez e Hafez, 2004).

Segundo o Manual ... (1998), a concentração sofre variações devido a fatores extrínsecos, como método de colheita, frequência de atividades do reprodutor, seu condicionamento, e fatores intrínsecos, como idade, tamanho e estado de hígidez testicular.

De acordo com Mies Filho (1987), a concentração de espermatozoides por centímetro cúbico na espécie caprina varia de 1.000.000 a 5.000.000 spz/mL, sendo a média 3.000.000. Já Hafez e Hafez, (2004) apresentaram a concentração variando de 2.000.000 a 6.000.000 spz/mL.

As alterações morfológicas do espermatozóide podem atingir as diversas partes constituintes, por exemplo: acrossoma, cabeça, colo, peça intermediária, cauda e, em alguns casos, tomar duas ou mais partes da célula simultaneamente (Mies Filho, 1987).

A avaliação da morfologia espermática pode ser realizada pela técnica de esfregaço corado ou pela preparação úmida, em microscópio de contraste de fases ou de interferência diferencial, associados ou não. O

método mais indicado é a preparação úmida (Manual ..., 1998). A montagem da preparação úmida consiste na colocação de uma gota (de sêmen formolizado) sobre lâmina, cobrindo-a de imediato com uma lamínula. Aplica-se sobre este conjunto um papel filtro pressionado-se suavemente a lâmina até que o excesso de líquido seja absorvido.

A análise morfológica deve ser realizada sobimersão (aumento de 1000x) onde as primeiras 200 células observadas (quando possível) são classificadas quanto aos defeitos de forma e estrutura.

Esta avaliação morfológica do espermatozoide chamou a atenção de vários pesquisadores, que tentaram interpretar as anormalidades e, assim, relacionar patologia espermática e fertilidade. Blom (1950) procurou dar uma interpretação dinâmica ao estudo da morfologia espermática, dividindo as anormalidades em duas classes: anormalidades primárias (verificadas durante o processo espermatogênico) e secundárias (afetam o espermatozoide depois de formado).

Deste modo, as anormalidades primárias são intragonadais, e as anormalidades secundárias são extragonadais, ambas, portanto, de origem interna ou endógena. Alguns autores acrescentam a essa classificação as anormalidades terciárias, causadas pela manipulação e em laboratório (externa ou exógena).

Devido às críticas decorrentes desta classificação de 1950, principalmente com relação à importância de tais anomalias na fertilidade, Blom (1972) propôs uma nova classificação visando à avaliação dos defeitos sistemáticos do touro. Para a contagem diferencial, os defeitos deverão ser considerados em duas classes: defeitos maiores (qualquer anormalidade que tenha sido relacionada com infertilidade ou condição patológica) e defeitos menores (qualquer forma de anormalidade reconhecida como de menor importância).

O somatório dos defeitos maiores e menores deve ser apresentado como defeitos totais. Na opinião de Blom (1972), somente quando excedendo 10 a 15% de defeitos menores, devem ser mencionados na contagem final; caso contrário, no laudo andrológico, apenas devem-se mencionar defeitos maiores e totais. Para caprinos, a porcentagem de espermatozoides normais é, em média, 80 a 90% (Mies Filho, 1987; Manual ..., 1998; Hafez e Hafez, 2004).

Existem ainda as avaliações complementares, não obrigatórias. Estas são usadas a critério do técnico responsável, com finalidade de ressaltar uma característica e/ou qualidade do sêmen, principalmente quando o objetivo é a comercialização ou para auxiliá-lo no diagnóstico de eventual anomalia. Estes testes são: testes de termorresistência, microbiológico, sorológico, avaliações de ultraestruturas (membrana, cromatina, acrossoma, mitocôndrias), entre outros.

### **Criopreservação do sêmen caprino**

#### *Diluidores e diluição*

Após a etapa de avaliação e considerando-se ter uma amostra de boa qualidade seminal, passa-se à fase de diluição. Para se obter um bom diluidor, é necessário que este tenha algumas propriedades indispensáveis, ou seja: deve ser atóxico para os espermatozoides, ter pH e pressão osmótica compatíveis com a sobrevivência espermática, ser de baixo custo e preparo fácil (Gonçalves *et al.*, 2002).

Os diluidores ou extensores podem ser confeccionados a partir de vários líquidos orgânicos, ou, então, as soluções podem ser preparadas em laboratório, usando-se sais minerais e outras substâncias, tendo sempre como solvente e água destilada ou destilada/deionizada (Mies Filho, 1987).

Os diluidores orgânicos podem ser preparados, por exemplo, com líquidos das glândulas anexas do aparelho genital de machos vasectomizados (sádios), considerando que os animais são da mesma espécie. Pode vir a ser um bom diluidor, posto que as características físico-químicas das amostras são similares; a desvantagem deste tipo de diluidor é que, normalmente, o volume de ejaculado de machos vasectomizados é menor, logo, necessitando, muitas vezes, de uma segunda colheita ou segundo doador de plasma seminal. Outro líquido orgânico que pode ser utilizado na preparação do diluidor é o próprio soro sanguíneo inativado a 60°C durante uma hora, ou mesmo o leite esterilizado.

Como exemplo de diluidor seminal preparado em laboratório, podem-se considerar as soluções fisiológicas comuns, dentre as quais se destacam a de cloreto de sódio (soro fisiológico) e a solução de ringer-lactato (Mies Filho, 1987).

Existem ainda os diluidores mistos, preparados a partir de líquidos orgânicos, porém ajustados por meio de adição de soluções salinas potencializadoras ou corretoras.

No caso do diluidor Tris-gema, são adicionadas fontes nutritivas, estabilizadoras e tamponantes para a manutenção das células espermáticas: a adição de frutose, de lactose e a própria gema do ovo têm a função de nutrir os espermatozoides; é importante salientar que a gema de ovo também tem propriedades termoprotetoras quanto ao resfriamento; o ácido cítrico e o Tris (hidroximetil)-aminometano têm função tampão; além disso, ainda são adicionados inibidores do crescimento microbiano, que, no caso, podem ser o bacteriostático aminoglicosídeo gentamicina.

Acredita-se que o ácido cítrico se comporte como um ativador da fosfatase ácida, sendo importante para a manutenção do equilíbrio osmótico, juntamente com o potássio e o sódio, favorecendo, deste modo, a atividade

espermática (Ibarra e Navaridas, 1992).

Sabe-se que o plasma seminal dos caprinos é rico em fosfolipase A, que, ao interagir com os fosfolipídeos da maioria dos diluidores, libera ácidos graxos e lisolecitinas, os quais são espermicidas (Roy, 1957; Aamdal *et al.*, 1965; Corteel, 1974).

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, porém, que não há hidrólise desses fosfolipídeos. Observaram ainda que a congelação do sêmen em diluente de tris-gema de ovo, sem a remoção do plasma seminal, produz altas taxas de fertilidade.

Este fato foi comprovado por Viana *et al.* (2006), que demonstraram a eficácia do diluidor Tris-gemafrente ao diluidor à base de leite desnatado-glicose, principalmente para os parâmetros motilidade, vigor, e patologias de acrossoma, contudo não houve diferença entre os diluidores quanto à patologia de cauda.

Atualmente inúmeras pesquisas vêm demonstrando o bom potencial da água de coco como diluente seminal em várias espécies, em especial para caprinos (Rodrigues *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2002).

A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, fornecendo os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (Blume e Marques Jr., 1994).

Em caninos não foram observadas diferenças significativas entre a utilização de diluidores à base de tris ou água de coco. Ambos apresentaram-se eficientes para uso na criopreservação do sêmen (Silva *et al.*, 2006).

No caso de sêmen com destino à congelação, a adição de substâncias crioprotetoras aos diluidores é fundamental para a sobrevivência dos espermatozoides durante o processo. A utilização de diversos crioprotetores e suas combinações pode minimizar e controlar os efeitos deletérios na célula durante os processos de congelação e descongelação (Rossi *et al.*, 2003). Várias substâncias podem ser utilizadas com esse objetivo, dentre elas: glicerol, etilenoglicol, dimetil-formamida, dimetil-sulfóxido (DMSO), entre outros.

O glicerol tem sido o crioprotetor mais utilizado para a congelação de sêmen caprino (Leboeuf *et al.*, 2000), embora sabe-se hoje o glicerol tenha seu objetivo alcançado até certa proporção, ou seja, se adicionada em proporções acima de 7% do volume total (diluidor + sêmen), esta substância torna-se tóxica às células espermáticas (Amann e Pickett, 1987; Graham, 2001; Gonçalves *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2002).

Polge *et al.* (1949) descobriram que o glicerol protege os espermatozoides contra os efeitos deletérios da congelação. Smith e Polge (1950) congelaram com sucesso sêmen de bovino e caprino, no ritmo de 1°C/min, de 0°C a -79°C.

Os diluidores escolhidos para criopreservação (com glicerol) passam por três etapas para sua utilização: (1) o volume de diluidor necessário é estimado e dividido por dois, uma fração A e uma fração B. A fração A possui 0% de glicerol e é armazenada em banho-maria, aguardando a mistura com o sêmen; e a fração B com 14% de glicerol é levada ao refrigerador a 4°C; (2) depois de atingida a temperatura ideal da fração A (37°C) ela é misturada na proporção de 1 parte de sêmen a 4,5 partes da fração A, incubando-se a mistura em banho-maria para avaliação e procedendo-se ao resfriamento até 4°C; (3) com a solução de sêmen a 4°C, mistura-se lentamente a fração B à solução de sêmen, este procedimento de mistura e estabilização do glicerol e o espermatozoide é denominado glicerolização (Gonçalves *et al.*, 2002).

O glicerol atua sobre as células espermáticas, protegendo-as ao modificar a rapidez da formação e o tipo de cristais que se formam durante o processo, além disso, estimula a respiração espermática, exercendo uma função de economia da glicólise aeróbica, e enseja a formação de frutose e sua subsequente utilização. Outro mecanismo do glicol seria o da proteção dos espermatozoides contra a hipertonia consequente à formação dos cristais extracelulares, durante o processo de congelação (Mies Filho, 1987).

### *Congelamento e descongelamento*

Os sêmen fresco e resfriado apresenta fertilidade mais elevada; o congelado preserva-se por um período de tempo indefinido, se mantido em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C e é de maior aplicabilidade, quando comparado ao sêmen resfriado a 4°C, cuja viabilidade máxima é de 48 horas (Nunes *et al.*, 1997).

Desde que os primeiros espermatozoides caprinos foram congelados por Smith e Polge (1950), inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando estabelecer protocolos de resfriamento e congelamento do sêmen caprino. Mascarenhas (1994) afirmou que o futuro da inseminação artificial em caprinos dependia do sucesso do congelamento do sêmen, sendo necessários mais estudos para melhorar os meios e as técnicas de criopreservação dos espermatozoides.

Os espermatozoides são muito mais sensíveis às modificações que possam ocorrer entre 35°C e 5°C, isto é, na faixa em que devem sofrer manipulações para conservação e transporte, verificando-se o chamado *choque térmico* se o rebaixamento da temperatura não se fizer de maneira lenta (Mies Filho, 1987).

Segundo Mies Filho (1987), o efeito brusco do frio provoca o enrolamento da cauda do espermatozoide, além de fraturas nos envoltórios, devido à maior contração da bainha lipoproteica em relação ao conteúdo



celular, degeneração do acrossoma, conseqüentemente perda de suas enzimas, lipoproteínas, potássio, fosfolipídios e ATP.

De acordo com Roy (1957), um problema específico na preservação do sêmen caprino está relacionado ao efeito deletério do plasma seminal na viabilidade dos espermatozoides criopreservados com diluentes contendo gema de ovo e/ou leite desnatado. Uma das explicações seria a síntese e as secreções de enzimas pelas glândulas bulbo-uretrais liberadas no plasma, as quais podem se associar aos componentes destes diluentes e produzir componentes tóxicos para a célula espermática. Esta condição desfavorável pode ser prevenida por meio da retirada do plasma seminal durante os procedimentos de criopreservação (Leboeuf *et al.*, 2000).

Segundo Mies Filho (1987), a descongelação não afeta muito os espermatozoides, logo é preferível que se adote um processo rápido de aquecimento, pois o aquecimento lento promove um maior desgaste do espermatozoide.

### Considerações finais

Com a expansão da caprinocultura, principalmente em países em desenvolvimento, muitas pesquisas têm sido realizadas para melhor exploração desta atividade. No entanto, em se tratando de raças nativas e sua adaptabilidade reprodutiva, principalmente quanto à morfologia escrotal (bipartição), poucas informações foram publicadas.

Atualmente a IA é uma técnica altamente recomendada para o manejo reprodutivo de caprinos, logo pesquisas envolvendo criopreservação e funcionalidade ultraestrutural de espermatozoides continuam sendo necessárias com o intuito de cada vez mais aperfeiçoar meios diluidores e incrementar os programas de IA.

### Referências

- Aamdal J, Lyngset O, Fossum K. Toxic effect of lysolecithin on sperm a preliminary report. *Nord Vet Med*, v.17, p.633-634, 1965.
- Almeida MM. *Vascularização arterial testicular e escrotal de caprinos nativos do Estado do Piauí, segundo grau de divisão do escroto, e a relação com parâmetros reprodutivos*. 2003. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2003.
- Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Blom E. A one minute live dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil Steril*, v.1, p.176-177, 1950.
- Blom E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. In: Symposium International di Zootechnie, 7, 1972, Milano. *Atti ... Milano: The Symposium, 1972. p.125-139.*
- Blume H, Marques Júnior AP. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.18, p.97-104, 1994.
- Campos ACN, Nunes JF, Monteiro AWU, Diógenes BOP, Pinheiro JHT, Guerra FFA. A água de coco criopreservada proveniente de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor do sêmen de caprinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.331-338, 2002.
- Chauhan MS, Anand SR. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, v.34, p.1003-1013, 1990.
- Corteel JM. Viabilité des spermatozoides de boue conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal effect du glucose. *Ann Biol Anim Biochim Biophys*, v.14, p.741-745, 1974.
- Cunha LAL, Salviano MB, Vieira RJ. Climatic seasonality influence on physical and morphological aspects of goat semen. *Anim Reprod*, v.3, p.252, 2006. (resumo. International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Belo Horizonte, Brazil, 2006).
- Fonseca JF. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005. Goiânia, GO. *Anais: Palestras ... Belo Horizonte: CBRA, 2005. CD-ROM.*
- Freitas VJF, Nunes JF Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. *Rev Bras Reprod Anim*, v.16, p.95-104, 1992.
- Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela; 2002. 195p.
- Graham J. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.239-247, 2001.
- Gunn RMC, Sanders RN, Granger W. *Studies of fertility in sheep: seminal changes affecting fertility in rams*. Australia: Council of Science and Industry Research, 1942. (Bulletin, 148).
- Guo CX, Tang TS, Mu XM. Cloning of novel temperature-related expressed sequence tags in rat testis during spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Com*, v.258, p.401-406, 1999.
- Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004.
- Hulet CV, Voigtlander HP, Pope AL. The nature of early season infertility in sheep. *J Anim Sci*, v.15, p.607-615, 1956.



- Ibarra MCB, Navaridas AS.** Variaciones estacionales de los niveles de frutosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. *Inv Agrar Prod San Anim*, v.7, p.235-240, 1992.
- Ikeda M, Kodama H, Fukuda J.** Role of radical oxygen species in rat testicular germ cells apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod*, v.61, p.393-399, 1999.
- Kumagai J, Fukuda J, Kodama H.** Germ cell-specific shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. *Eur J Biochem*, v.267, p.3073-3078, 2000.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141, 2000.
- Machado R, Simplicio AA, Pinheiro A.** Testes objetivos do comportamento sexual do bode. *Rev Bras Reprod Anim*, v.18, p.19-30, 1994.
- Machado Júnior AAN.** *Influência da morfologia escrotal sobre a termorregulação, a biometria escrototesticular e o comportamento sexual de caprinos nos períodos seco e chuvoso do Estado do Piauí.* 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.
- Manual** para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, CBRA, 1998.
- Mascarenhas R.** Inseminação artificial em caprinos: produção e conservação de sêmen. *Vet Téc*, p.4-7, 1994.
- Medeiros ASL.** Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, v.58, p.273-276, 2002.
- Mies Filho A.** *Reprodução dos animais.* 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.
- Monteiro AWU, Campos ACN, Nunes JF, Diogenes BOP, Pinheiro JHT, Figueiredo EL.** Inseminação artificial de caprinos com sêmen diluído em água de coco criopreservada. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, n.5, p.98-100, 2002.
- Moore CR.** Heat application and degeneration testicular; the function of the scrotum. *Am J Anat*, v.34, p.337-349, 1924.
- Morrow DA.** *Current therapy in theriogenology.* 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. 1084p.
- Nunes JF, Ciriaco ALT, Suassuna U.** *Produção e reprodução de caprinos e ovinos.* 2.ed. Fortaleza: LCR, 1997.
- Nunes JF, Riera GS, Silva AEFD, Ponce de Leon FA, Lima FAM.** *Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal.* Sobral: EMBRAPA/CNPCaprinos, 1983. 11p. (Circular Técnica, 6).
- Philips RW, McKenzie FF.** The thermo-regulatory function and mechanism of the scrotum. *Mo Agric Exp Sta Res Bull*, n.217, p.1-76, 1934.
- Polge C, Smith AU, Parker AS.** After vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.167, p.626, 1949.
- Pugh DG.** *Clínica de ovinos e caprinos.* São Paulo: Roca, 2005.
- Radostits OM, Mayhew, IGJ, Houston DM.** *Exame clínico e diagnóstico em veterinária.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- Robertshaw D.** Concepts in animal adaptation: thermoregulation of the goat. *In: International Conference on Goat Production and Disease*, 3, 1982, Tucson, AZ. *Proceedings ...* Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p.395-397.
- Rodrigues APR, Torres MZG, Oliveira LF.** Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino. *In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 23, 1994, Olinda, PE. *Anais ...* Olinda, PE: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p.540. (Resumo).
- Rossi TC, Papa FO, Santos TB.** Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.350-352, 2003.
- Roy A.** Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, p.179-318, 1957.
- Salvador DF, Dias JC, Vale Filho VR.** Perfil andrológico de touros da raça Nelore com três e quatro anos de idade, criados extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.64-67, 2002.
- Salviano MB, Cavalcante TV, Souza JAT.** Integrity of sperm DNA of native bucks after scrotum conformation. *Anim Reprod*, v.3, p.252, 2006. (Resumo. International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Belo Horizonte, Brazil, 2006).
- Santos FCB.** *Características seminais, comportamento sexual e conforto térmico de reprodutores caprinos na região semi-árida do estado da Paraíba.* 2003. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2003.
- Santos FCB, Peña-Alfaro CE, Souza BB, César MF, Pimenta Filho EC, Pereira WE, Acosta AAA.** Influência da aptidão produtiva (leite ou carne) sobre a libido de bodes de raças exóticas e naturais da região semi-árida do nordeste brasileiro. *Ci Agrotec*, v.29, p.683-688, 2005.
- Setchell BP.** The parkers lecture: heat and testis. *J Reprod Fertil*, v.114, p.179-194, 1998.





**Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.43, p.767-774, 2006.

**Silva JM.** *Proporção de espermatozoides portadores de cromossomos X ou Y e concentrações séricas de testosterona em caprinos segundo a conformação escrotal.* 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.

**Smith AH, Polge C.** Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, v.166, p.668-671, 1950.

**Swenson MJ, Reece WO.** *Dukes. Fisiologia dos animais domésticos.* 11.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996.

**Viana AKDS, Chalhoub B, RibeiroFilho 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. *Ci Anim Bras*, v.7, n.1, p.67-76, 2006.

**Villares JB** Bioclimatologia da reprodução animal: revisão sobre efeitos do ambiente de calor. *In: Simpósio Nacional de Reprodução Animal*, 2, 1976, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1976. p.192-215.

**Vogler CJ, Saacke RG, Bame JH** Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *J Dairy Sci*, v.74, p.3827-3835, 1991.

---