

CONSIDERAÇÕES SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CAPRINOS

[*Considerations on goat semen cryopreservation*]

Thibério de Souza Castelo¹, Thiago Rodrigues Frota², Alexandre Rodrigues Silva^{3,*}

¹Aluno do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN.

²Médico Veterinário Autônomo.

³Prof. Dr. do Departamento de Ciências Animais, UFERSA.

RESUMO - A criopreservação de sêmen é uma importante biotécnica reprodutiva, tendo em vista que promove a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado. Tal biotécnica, quando associada à inseminação artificial, representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de excelente qualidade. A criopreservação do sêmen proporciona uma economia para o produtor ao reduzir os custos com alimentação e transporte dos reprodutores, bem como os riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. O sêmen caprino possui uma particularidade importante a ser considerada para sua criopreservação visto que a interação do plasma seminal com a gema de ovo, substância amplamente empregada na composição de diluentes, é deletéria ao espermatozóide dessa espécie. Essa revisão faz um levantamento geral acerca dos principais aspectos ligados à criopreservação do sêmen caprino e traz informações científicas atualizadas sobre o assunto. São discutidos as formas de criopreservação e descongelação mais utilizadas, bem como os principais diluentes e crioprotetores.

Palavras-Chave: Criopreservação, sêmen, caprino.

ABSTRACT - The goat semen cryopreservation is an important reproductive biotechnology that promotes the conservation of male germplasm indefinitely. This technique, associated to the artificial insemination, represents an efficient mechanism for promotion and diffusion of the high quality genetic material. Semen cryopreservation provides an economy for the producer when reducing the costs with feeding and transport of the stud males, as well as the risks of transmission of sexually transmissible diseases. The goat semen presents an important characteristic that must be considered for its cryopreservation since that the interaction between seminal plasma and egg yolk, a substance largely used in semen extenders, is deleterious for the spermatozoa. This revision makes a general rising concerning the main aspects linked to the cryopreservation of goat semen and updates scientific information on this subject. The usual freezing and thawing methods are discussed, as well as the main extenders and cryoprotectants.

Keywords: Cryopreservation, semen, goat.

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen é um processo complexo, onde é importante atentar para diversos fatores a fim de obter resultados satisfatórios. Dentre esses fatores, destacam-se a diluição, a criopreservação, descongelação e também a fisiologia do sêmen de cada espécie. O processo de criopreservação de sêmen, além de possibilitar sua utilização por longo período, reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores;

favorece rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes; minimiza a possibilidade de introdução de doenças transmissíveis via sêmen numa região e /ou país e a transmissão e propagação de doenças sexualmente transmissíveis nos rebanhos (Traldi, 1994).

O sêmen caprino pode ser usado a fresco (puro ou diluído), resfriado ou criopreservado. O sêmen fresco e o resfriado apresentam fertilidade mais elevada, mas de uso restrito ao período de atividade

* Autor para correspondência. DCA/UFERSA, BR 110 Km 47, 59625-900, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: legio2000@yahoo.com.

sexual dos machos, haja vista ser uma espécie que, em determinadas regiões, apresenta estacionalidade reprodutiva em virtude do fotoperíodo. Já o sêmen criopreservado pode ser mantido por um longo período armazenado em nitrogênio líquido, apresentando maior aplicabilidade (Traldi, 2006).

O presente trabalho apresenta um levantamento geral acerca dos principais aspectos ligados à criopreservação do sêmen caprino e traz informações científicas atualizadas sobre o assunto. Desse modo, são tecidas considerações sobre o plasma seminal caprino, os métodos de colheita e avaliação de sêmen, em seguida, abordando-se assuntos relacionados aos diluentes, crioprotetores, protocolos de criopreservação e descongelação.

PLASMA SEMINAL CAPRINO

Durante vários anos, técnicas de preservação de sêmen bovino foram adaptadas empiricamente para a conservação do sêmen caprino, sem muito sucesso. Diluentes contendo gema de ovo ou leite foram usados por décadas para esse propósito, com sucesso limitado (Amoah e Gelaye, 1997). Passados alguns anos, descobriu-se que a diluição do sêmen caprino em diluentes contendo gema de ovo ou leite desnatado pode ser nociva para as células espermáticas (Iritani e Nishikawa, 1963).

Segundo Roy (1957) e Gibbons (2002), a secreção da glândula bulbo-uretral possui uma enzima (EYCE) que coagula a gema de ovo. Os mesmos ainda afirmam que na presença de cálcio, a EYCE, que é uma fosfolipase A, atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitina. Esta reação de hidrólise promove uma atividade fusogênica na membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina.

Uma fração glico-protéica do plasma seminal caprino (SBUIII), também originada das glândulas bulbo-uretrais, interage com o diluente à base de leite, provocando inibição da motilidade, ruptura do acrossoma e morte celular espermática. A SBUIII foi identificada por Nunes (1982) e é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e triglicerídeos no leite desnatado, resultando em um ácido graxo, o ácido oléico, que é tóxico aos espermatozoides (Pellicer-Rubio et al., 1997).

Segundo Nunes (1982), o efeito deletério do plasma seminal se deve à secreção de grandes quantidades de fosfolipase A, durante a fase sexual, agindo sobre

os fosfolipídios dos diluentes. O mesmo autor, demonstrou que a congelação do sêmen caprino diluído em leite, contendo acima de 10 mg de fosfolipídios causa a morte de todos os espermatozoides.

O método convencional de superar as interações prejudiciais do plasma seminal e as proteínas da gema de ovo ou do leite é diluir a amostra de sêmen caprino num diluente tamponado e, então, separar o plasma seminal do esperma através de centrifugação (Purdy, 2006). Segundo este autor, o sêmen pode ser centrifugado a 550-950 x g por 10 a 15 minutos. Entretanto, Aboagla e Terada (2004a) sugerem a centrifugação do sêmen caprino diluído em Tris-citrato-glicose a 1600 x g, duas vezes, por 30 minutos cada vez.

Em geral, não existe consenso no que diz respeito à necessidade de retirada do plasma seminal. Segundo o método de Ritar e Salamon (1982), o diluente a base de Tris, gema de ovo e glicerol deve ser adicionado ao sêmen sem a retirada do plasma seminal, sendo a proporção de gema de ovo e glicerol de 2 e 4%, respectivamente. Chauhan e Anand (1990) observaram que a criopreservação do sêmen caprino em diluente à base de Tris-gema de ovo, sem a remoção do plasma seminal, produz altas taxas de fertilidade. Em adição, Azeredo et al (2001) verificaram que a motilidade dos espermatozoides sofre aumento quando o plasma seminal está presente, e que a porcentagem de espermatozoides com membranas lesadas aumenta com a retirada do plasma seminal por centrifugação, sendo ainda, acentuada pela criopreservação e descongelação. Dessa forma, esses autores concluem que a remoção do plasma seminal seria prejudicial para a criopreservação de sêmen caprino.

Recentemente, foi sugerido que a adição do plasma seminal à amostra de sêmen caprino descongelada poderia reverter a capacitação precoce induzida pelo procedimento de criopreservação. Entretanto, tal adição não proporcionou um aumento de fertilidade após a inseminação artificial com essas amostras (Abad et al., 2007).

COLHEITA E AVALIAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

A colheita de sêmen caprino é usualmente efetuada por meio de vagina artificial (VA), mas pode-se também fazer uso de um eletroejaculador, ou pode ser realizada cirurgicamente com acesso à cauda do epidídimo (Kundu et al., 2002). A eletroejaculação é

um método pouco utilizado para a colheita de sêmen na espécie caprina. Segundo Lima (2008), este método fica reservado às situações em que o animal encontra-se impossibilitado de realizar a monta por um defeito de aprumo adquirido ou outro problema que o impeça de monta.

A VA é um instrumento que simula as condições de pressão e temperatura de uma vagina natural. Para a coleta, é necessário utilizar uma cabra com estro induzido ou natural como manequim, para que o macho realize o salto. O manipulador deve desviar o pênis do animal, segurando pelo prepúcio, em direção a VA. É de extrema importância a manutenção do sêmen sob a proteção da luz solar e poeira, bem como evitar agitações bruscas (Granados et al., 2006). Segundo Yamashiro et al. (2006), a presença de albumina sérica bovina (BSA) nos tubos de coleta, proporcionam uma melhora nos resultados de motilidade e integridade acrossomal após a descongelação.

Para se obter ejaculados de ótima qualidade e volume, recomenda-se estabelecer um programa de coleta semanal de sêmen caprino. Este programa consiste, usualmente, na realização de uma coleta por dia, durante cinco dias, com descanso de 48h, podendo-se fazer uso de bodes a partir de 7 a 8 meses de idade (Gibbons, 2002). Após a coleta, o sêmen caprino deve ser avaliado de acordo com parâmetros macro e microscópicos. No exame macroscópico, avalia-se o volume (0,5 a 2,0 mL), a cor (amarelada a acinzentada) e o aspecto (leitoso a cremoso). Tais parâmetros podem apresentar diferenças entre animais e entre ejaculados de um mesmo animal (Santos et al., 2006).

No que diz respeito às avaliações microscópicas, a concentração espermática pode ser determinada com auxílio de espectrofotometria ou de microscopia, utilizando-se a câmara de Neubauer (Santos et al., 2006). O valor normal da concentração espermática para caprinos está em torno de $3 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, podendo variar entre $2,5 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ a $5,0 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$. Avalia-se ainda a presença do turbilhonamento (motilidade massal), que é o movimento da massa de espermatozóides no plasma seminal (0 – 5) e a motilidade individual progressiva (MIP), que representa o movimento em flecha de cada espermatozóide individualmente, variando de 0 a 5, sendo que para a criopreservação, deve ser utilizado somente sêmen com valor acima de 3. Deve-se ainda realizar a confecção de esfregaços visando a avaliação da morfologia espermática (Nunes et al., 2002 e Hafez e Hafez, 2004).

DILUENTES

Os ejaculados da maioria dos animais domésticos contêm mais espermatozóides que o necessário para uma fecundação. Diluindo-se o sêmen, ele pode ser utilizado para uma série de inseminações. De acordo com Neves et al., (1983), a elevada concentração espermática determina uma intensa atividade metabólica com rápido acúmulo de catabólitos no plasma seminal, extremamente prejudicial à célula espermática. A diminuição da concentração, até certos limites, resultaria numa maior proporção diluente/espermatozóide, o que significa maior proteção celular. Elevadas diluições, porém, não levam a uma congelabilidade adequada (Azevedo et al., 2000). Um parâmetro de eficiência a ser considerado na criopreservação do sêmen é o número mínimo de espermatozóides móveis que deverá conter a dose inseminante, tornando muito mais efetivo o aproveitamento do ejaculado (Azevedo et al., 2000).

As principais características de um diluente são: a extensão do volume, a fim de aumentar a quantidade de doses inseminantes e conseqüentemente o número de animais inseminados; efeito tamponante, já que os espermatozóides possuem fraca resistência contra alterações de pH; manutenção da pressão osmótica, mantendo o diluente o mais próximo possível da pressão do plasma seminal (285 mOsm), através da adição de substâncias como açúcares; substrato energético, sendo também os açúcares que provém energia para espermatozóides, e por último, atividade antimicrobiana, que consiste na adição de antibióticos, a fim de reduzir a transmissão de bactérias patogênicas e a carga de bactérias não-patogênicas que contaminam o sêmen. Ainda um diluente ideal deve possuir substâncias estabilizadoras de membrana e acima de tudo ser de fácil preparo e de baixo custo (Watson, 1979). Segundo Gibbons (2002), um diluente para ser usado na criopreservação do sêmen caprino deve ser constituído por substâncias tampão, como o Tris e citrato de sódio; fontes energéticas, como a glicose e a frutose; crioprotetores externos como a gema de ovo ou o leite, ou internos, como o glicerol e o etilenoglicol; bem como os antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados.

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) é o principal componente básico dos diluentes de sêmen caprino utilizados rotineiramente (Choe et al., 2006; Dorado et al., 2007ab). Ele é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de

pureza na forma de cristais. Ele atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail e Goodman, 1984). Kober (1985 – apud Rodrigues, 1997) reportou que o Tris não apenas apresenta atividade tamponante, mas que também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia.

Estudos mostraram que outras substâncias podem ser utilizadas como diluentes para o sêmen caprino com sucesso. Uma delas é a água do coco (*Cocos nucifera*), uma solução estéril, contendo sais, proteínas, açúcares, vitaminas, minerais, fatores de crescimento e gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhes confere densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, fornecendo, desta forma, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência dos gametas masculinos criopreservados. O ácido 3-indol-acético é um fitormônio que estimula o crescimento dos vegetais, o qual foi isolado primeiramente por Nunes e Combarous (1995), que descobriram que esta substância promove incremento na motilidade do espermatozóide. Em estudo realizado por Campos (1999) para verificar a viabilidade deste diluente para a congelação do sêmen caprino, ficou constatado que a água de coco criopreservada a -196°C comportou-se como ótimo diluidor do sêmen caprino, possibilitando seu uso em regiões onde inexista o coqueiro, bem como facilitando o armazenamento, conservação e transporte desta solução.

É também conhecida a atuação do leite como um diluente para o sêmen caprino (Betini et al., 1998). O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação dos espermatozóides por possuir certa capacidade tampão, ação bactericida, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozóides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozóides na produção de energia. Sabe-se que duas substâncias responsáveis por esta característica são: a lactose, que age como elemento energético, e a caseína que é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozóides (Cunha, 2002). Souza et al. (2006) citam o uso de um diluente à base de leite em pó desnatado para a congelação do sêmen de caprinos, mas recomendam a adição do antibiótico gentamicina na concentração de 13,3 mg/mL, visando controlar a contaminação bacteriana nas amostras. Recentemente, Dorado et al. (2007a) demonstraram que amostras de sêmen caprino congeladas nesse diluente promovem taxas de gestação superiores às aquelas obtidas com o Tris.

Aboagla e Terada (2003) demonstraram o uso de um diluente à base de Trealose e gema de ovo para a criopreservação do sêmen de caprinos e verificaram, após descongelação, motilidade espermática de 73% e motilidade progressiva de 57%, enquanto os resultados para Tris-citrato-gema ficaram em 59% e 46%. Porém, maiores estudos são ainda necessários com este diluente.

CRIOPROTETORES

A criopreservação do sêmen altera as características das membranas dos espermatozóides, interferindo na sua capacidade fertilizante. Durante as fases de congelação e descongelação, ocorrem flutuações no volume celular, que contribuem para o dano celular quando os limites de tolerância das membranas são ultrapassados. (Becker-Silva, 2004). Os espermatozóides submetidos a essa técnica, sofrem injúrias e morte, devido a formação de cristais de gelo no seu interior. Este fenômeno físico ocorre quando rápidas taxas de resfriamento são usadas. Além disso, ocorre o desenvolvimento de regiões com elevada concentração de soluto, que desidratam a célula quando taxas lentas de resfriamento são usadas (Azevedo et al. 2000).

Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se úteis como agentes crioprotetores. Os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen são macromoléculas, como a caseína do leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol (Evans e Maxwell, 1987). Conforme Gil et al., (2003), o uso de aditivos de origem animal como gema de ovo e leite na diluição pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto.

Os agentes crioprotetores podem ser classificados em não penetrantes, que aumentam a osmolaridade do meio extracelular, e são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo assim, a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação; e em agentes crioprotetores penetrantes, os quais são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a criopreservação causa sobre a célula. As características físico-químicas ideais que eles devem possuir são: baixo peso molecular; alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (Gonzalez, 2004).

A gema de ovo de galinha protege a membrana plasmática da célula espermática, restaurando fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento do sêmen (Hammerstedt et al., 1990). Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina. Durante o choque térmico, as lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção. A gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática (Foulkes, 1977). Visto que a mesma também tem capacidade de tampão, sua quantidade no meio varia de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluente. De acordo com Aboagla e Terada (2004b), a adição de gema de ovo aos diluentes para o sêmen caprino significativamente aumenta a proporção de espermatozoides móveis recuperados após a descongelação. Estes mesmos autores citam que a combinação de gema de ovo e glicerol promove injúria ao acrossoma, mas quando usados separadamente não há tamanha injúria.

Aboagla e Terada (2004a) sugerem que a adição de dodecil-sulfato de sódio (SDS) aumenta a solubilização das substâncias contidas na gema de ovo, fazendo com que elas se tornem mais acessíveis aos espermatozoides, melhorando a congelabilidade do sêmen caprino. Segundo Bittencourt (2006), a adição do Equex STM, que possui o SDS como substância ativa, ao diluente promove uma melhoria na viabilidade espermática pós-descongelação.

O glicerol é quimicamente considerado um álcool, sendo o principal crioprotetor utilizado para espermatozoides. Seu efeito se relaciona à sua capacidade de ligação com a água e à baixa dissociação com sais. Estas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa (Gonzalez, 2004). O glicerol interage com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, baixando a temperatura de transição de fase dos lipídios da membrana e diminuindo a adesão entre as células (Kundu et al., 2000). Este efeito crioprotetor do glicerol parece se estabelecer em menos de cinco minutos após sua adição (Becker-Silva, 2004).

Apesar de seus efeitos protetores, em determinadas situações, o glicerol pode ser tóxico à célula espermática, sendo importante determinar sua concentração ideal em cada diluente, para que ele possa proporcionar um efeito benéfico ao sêmen.

Tanto o glicerol, como o dimetil-sulfóxido e o etileno glicol, são utilizados em concentração variando de um a 8%, sendo que os melhores resultados têm sido obtidos quando da utilização do glicerol a 6% (Tuli e Holtz, 1994; Singh et al., 1995).

Bittencourt et al. (2004) estudaram o efeito do etilenoglicol como crioprotetor para o sêmen caprino, mas observaram que seus efeitos tóxicos comprometem a qualidade do sêmen após a descongelação. Já Silva et al. (2006) demonstraram que a dimetilformamida isolada ou associada ao glicerol, não traz benefícios para a criopreservação de sêmen caprino. A associação do glicerol com o dimetilsulfóxido já foi também estudada, tendo apresentado resultados positivos na criopreservação do sêmen desses animais (Kundu et al., 2001). Kundu et al., (2002) reportaram a associação de um polímero dextran ao glicerol e ao dimetil-sulfóxido e observaram um incremento na motilidade do sêmen caprino epididimário após a criopreservação.

CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação mantém a vida fértil do sêmen por um período indefinido à temperatura de -196°C em nitrogênio líquido, entretanto grande proporção de espermatozoides não consegue sobreviver ao processo de congelamento e descongelamento (Noakes et al., 2001). A velocidade de congelamento é responsável pela cristalização e vitrificação da água intra-espermática. Se há uma congelamento mais lento, a cristalização da água livre extra-espermática dá origem a uma exosmose e desidrata a célula espermática. A congelamento rápida evita esta desidratação dos espermatozoides e, conseqüentemente, promove menos danos à célula. (Azevedo et al., 2000).

É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen dos ungulados, entre 30 a 0 °C induz um estresse letal para algumas células, sendo este proporcional à taxa de resfriamento, ao intervalo de temperatura e ao limite de temperatura. Esse processo é conhecido como choque térmico, que afeta variavelmente as espécies (Watson, 2000). Desta forma, uma taxa de resfriamento adequada é necessária para prevenir danos estruturais, bioquímicos e biofísicos a membrana. Rovay et al. (2006) mostraram uma maior eficiência de um resfriamento não linear antes da congelamento, apresentando motilidade total e percentagem de células vivas maior que quando submetido ao resfriamento linear.

Para criopreservação é importante a diluição do ejaculado através de diluente adicionado de crioprotetores. Segundo Purdy (2006), a taxa de diluição do sêmen caprino pode variar entre 1:1 a 1:23 (sêmen : diluente), sendo passível de utilização de uma dose prática de 1:9 quando não se dispõe de meios para determinar, com eficácia, a concentração pós-diluição de aproximadamente 200×10^6 espermatozoides/mL (Nunes, 2002). O autor citado anteriormente exemplifica que, para um ejaculado de 1,5 mL, pode-se adicionar 13,5mL de diluente, resultando em 15 mL de sêmen diluído, suficiente para inseminar 30 fêmeas, usando-se palhetas de 0,5mL. Barbas et al. (2006) utilizaram uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL, mas com palhetas de 0.25 mL, o que resulta numa concentração de 50×10^6 espermatozoides/palheta.

O glicerol, embora seja crioprotetor, possui efeitos tóxicos aos espermatozoides que se manifestam em temperaturas superiores a 20°C (Watson, 1979). Assim, a diluição do sêmen caprino pode ser realizada em duas etapas, sendo realizada uma primeira diluição com a fração de diluente sem glicerol na proporção de uma parte de sêmen para 4,5 partes de diluente (Neves et al., 2008). A diluição deve ser realizada logo depois da coleta do sêmen, sendo que o ejaculado e o diluente devem ser mantidos em banho-maria a 37° por 5 minutos para garantir que os dois possuam a mesma temperatura. A diluição é feita fluindo lentamente o diluente para o tubo contendo o sêmen e depois a mistura é retornada para o tubo do diluente. Após a diluição inicial, o sêmen deve ser resfriado em geladeira por 45 minutos dentro de um recipiente contendo água, até atingir 12° C, sendo levado, em seguida, a um freezer para que atinja a marca de 4°C. Nessa temperatura é realizada a glicerolização, com a fração do diluente que contém glicerol, em três etapas, que constam da adição, a cada 5 minutos, de uma alíquota do diluente, fazendo com que o volume dobre e que a primeira diluição seja reduzida pela metade (Neves et al., 2008).

A cada acréscimo de quaisquer substâncias, há necessidade de permitir um tempo de equilíbrio entre as substâncias, sendo que este tempo é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com o glicerol e todos os demais componentes do diluente, previamente à congelação. Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular. Segundo Bittencourt et al. (2006), há uma maior eficiência do tempo de estabilização de 2 horas quando comparado a uma.

Para o envasamento do sêmen, utilizam-se palhetas plásticas de 0,5 ou 0,25 mL. O procedimento de envase é simples, podendo ser feito de maneira manual ou utilizando-se uma seladora elétrica. As doses devem ser identificadas com dados do animal e do dia de processamento (Neves et al., 2008). Azevedo et al., (2000) relatam que o envase em palhetas de 0,25 ml promove maiores danos as células espermáticas que nas palhetas médias de 0,5 ml. Segundo Gibbons (2002), o processo de inseminação artificial laparoscópica (IAL) permite que a concentração espermática nas palhetas seja diminuída pela metade (50×10^6 spz), quando comparada à inseminação artificial cervical (IAC), sendo que as porcentagens de parição variaram, em seus estudos, entre 40 a 46% (para IAC) e entre 45 e 60% (para IAL).

Após serem mantidas a 4°C, as amostras já envasadas devem entrar em contato com o vapor do nitrogênio líquido por 20min, a um altura de 6 cm da lamina de nitrogênio e só então efetua-se a congelação e armazenamento em nitrogênio líquido a 196°C negativos. Segundo a metodologia adotada por Becker-Silva (2004), após as amostras atingirem 4°C, elas são deixadas em contato com o vapor do nitrogênio líquido por apenas 9 min a 2 cm da lamina para em seguida serem mergulhadas no N₂.

DESCONGELAÇÃO

O processo de descongelação das amostras de sêmen é determinado pelo método de congelação usado, por exemplo, amostras peletizadas são descongeladas em um tubo seco a 37°C, enquanto as amostras nas palhetas podem ser descongeladas de diversas maneiras (Evans e Maxwell, 1987). Em bovinos, o procedimento usual de descongelação é mergulhar as palhetas em água a 35°C por 20 a 30s quando se utiliza de palhetas de 0,25mL ou 40 a 60s para palhetas de 0,5mL, sendo que após a descongelação, o ideal é utilizar a dose de sêmen num máximo de 15 min (Ball e Peters, 2006).

Já nos caprinos, tradicionalmente, a descongelação a 37°C por 12-30s obtém resultados superiores que quando descongelados a 5°C por 2 min (Purdy, 2006). Ao se comparar a descongelação a 70°C por 7s com o processo a 37°C por 2 min e 40°C por 20s, o primeiro proporciona melhor motilidade progressiva espermática e integridade da membrana plasmática (Tuli et al., 1991). Azerêdo et al., (2001) observaram que amostras descongeladas a 70°C por 5s apresentaram taxas de membranas intactas mais

altas quando comparadas àquelas descongeladas a 35°C por 12s.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil possui 12,6 milhões de cabeças de caprinos e está colocado como o décimo primeiro produtor mundial (FAO, 2000). O efetivo de caprinos da região Nordeste representa 93,15% do rebanho nacional (ARAÚJO, 2002), o que faz da caprinocultura uma importante alternativa para o desenvolvimento social e econômico dessa região. Entretanto, o emprego de biotécnicas reprodutivas, como a tecnologia de sêmen e a inseminação artificial, que quando corretamente usadas contribuem fortemente para o melhoramento genético do rebanho, tem sido subutilizado, principalmente na Zona Semi-Árida da região nordestina.

Os caprinos são animais que proporcionam uma rentabilidade elevada ao produtor e ainda são fonte de produtos de elevado valor biológico. É importante a realização de estudos visando a maximização do potencial reprodutivo desses animais. A criopreservação proporciona uma estocagem do sêmen de animais de alto valor por tempo indeterminado, maximizando assim o poder reprodutivo do macho e permitindo seu uso mesmo após a morte do animal. Além disso, reduz os custos com criação de reprodutores, tendo em vista que se pode adquirir sêmen congelado com qualidade comprovada.

Ao que foi exposto no texto, verificou-se a importância da utilização de protocolos de criopreservação eficientes para que sejam obtidos resultados satisfatórios quando o sêmen vir a ser utilizado em inseminações artificiais. Apesar de ser um assunto largamente discutido, a criopreservação do sêmen caprino é um assunto em freqüente evolução, principalmente, com a realização de pesquisas com o intuito de melhorar a longevidade espermática pós-descongelação, a qual é conhecida por ser muito baixa, resultante de alterações oriundas do processamento das amostras (Abad et al., 2007).

REFERÊNCIAS

Abad M., Sprecher D.J., Friendship R.M., Kirkwood R.N. 2007. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 149-152.

Aboagla E.M.E., Terada T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69: 1245-1250.

Aboagla E.M.F., Terada T. 2004a. Effects of the supplementation of the trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 809-818.

Aboagla E.M.E., Terada T. 2004b. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1160-1172.

Amoah E.A., Gelaye S. 1997. Biotechnological advances in goat reproduction. *J. Anim. Sci.* 75: 578-585.

Araújo G.G.L. 2002. Alternativas de alimentação para caprinos. In: Simpósio Paraibano de Zootecnia, 3, 2002, Areia. Anais... Areia, p. 23.

Azevedo H.C., Machado R., Simplício A.A., Soares A.T. 2000. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. *Rev. Cient. Rur.* 5(2): 148-157.

Azerêdo G. A., Esper C. R., Resende K. T. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rum. Rese.* 41: 257-263.

Ball P.J. H., Peters, A. R. 2006. Reprodução em bovinos. 3 ed. São Paulo: Roca, p. 118-133.

Barbas J.P., Marques C.C., Baptista M.C.V., Pereira R. M., Cavaco-Gonçalves S., Mascarenha R.M., Nati P., Cognie Y., Horta A.E.M. 2006. Reproduction in the goat Serrana breed: seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, in vivo and in vitro fertility. In: Animal products from the Mediterranean area; EAAP publication 119: 337-342.

Becker-Silva S. C. 2004. Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 121p.

Betini C.M., Moraes G.V., Rigolon L.P. 1998. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. *Acta Sci.* 20: 361-365.

Bittencourt R.F., Ribeiro A.L., Santos A.D.F., Furst R., Teixeira R.B.S., Chaloub M., Portela A.P., Alves S.G.G., Almeida A.K., Guimarães J.D. 2004. Utilização de glicerol e etilenoglicol com crioprotetores na congelação do sêmen caprino. *Ci. Anim. Bras.* 5: 17-32.

Bittencourt R. F. 2006. Criopreservação de sêmen caprino: influência dos diluidores de congelação, tempos de equilíbrio e curvas de resfriamento. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 88f.

Bittencourt R.F., Ribeiro-Filho A.L., Alves S.G.G., Biscarde C.E., Vasconcelos M. F., Oba E. 2006. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 7(1): 27-37.

Campos A.C.N. 1999. A água de coco criopreservada, proveniente de frutos de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor do sêmen caprino. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 45p.

Chauhan M.S., Anand S.R. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34: 1003-1013.

Choe C.Y., Kim J.G., Choe S.R., Son D.S., Kim Y.K., Balasubramanian S., Choe S.Y., Rho G.J. 2006. Influence of

- seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 55-60.
- Cunha I.C.N. 2002. Criopreservação do sêmen de cães. Tese Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 149p.
- Dorado J., Rodriguez I., Hidalgo M. 2007a. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68: 168-177.
- Dorado J., Hidalgo M., Muñoz A., Rodriguez I. 2007b. Assessment of goat semen freezability according to spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2008.04.005.
- Evans G., Maxwell W.M.C. 1987. Frozen storage of semen. In: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Wellington: Butterworths, p. 122-141.
- FAO. 2000. *Quart. Bull. Statistics* 8(2):35.
- Foulkes J.A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 49: 277-284.
- Gibbons A. 2002. Inseminación artificial con semen congelado en cabras da raza angora. *Rev. Taurus* 4(16): 24-32.
- Gil J.L., Niels S.L., Rodríguez-Martínez H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59: 1241-1255.
- Gonzalez R.A.F. 2004. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozóide bovino. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo. Pirassununga.
- Granados L.B.C., Dias A.J.B., Sales M. P. 2006. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. Campos dos Goytacazes-RJ: Proj. Proex/UENF. 54p.
- Hafez E.S.E., Hafez B. 2004. *Reprodução Animal*. 7 ed. São Paulo: Manole, 513p.
- Hammerstedt R.H., Graham J.K., Nolan J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11:73-88.
- Iritani A., Nishikawa. 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 8: 113-117.
- Kundu C.N., Chakraborty J., Dutta P., Bhattacharyya D., Ghosh A., Majumder G.C. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40:117-125.
- Kundu C.N., Das K., Majumder G.C. 2001. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 41: 21-27.
- Kundu C.N., Chakraborty J., Dutta P., Bhattacharyya D., Ghosh A., Majumder G.C. 2002. Effect of dextran on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*. 123: 907-913.
- Lima A.J. 2008. Coleta, conservação de sêmen e inseminação artificial de caprinos e ovinos. <http://www.serratalhada.net/meioambiente/mostra.asp?noticia=noticia22.asp> In: Acesso em 18 de outubro de 2008.
- McPhail D.B., Goodman B.A. 1984. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. *Biochem. J.* 221: 559-560.
- Neves J. P., Blaya M.C.R., Teixeira P.R. 1983. Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. *A Hora Vet.* 14: 11-14.
- Neves J.P., Nunes J.F., Moraes J.C.F., Souza C.J.H., Salgueiro C.C.M., Almeida J.L.A. 2008. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2ª ed. São Paulo: Roca Ltda. p.83-103.
- Noakes D.E., Parkison T.J., England G.C.W. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8ª. ed. London: Saunders, 868 p.
- Nunes J. 1982. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc., 33f. These de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie. Paris.
- Nunes J.F., Combarous Y. 1995. Utilização da água de côco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: Anais do Simpósio de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos, Fortaleza, p.53-64.
- Nunes J.F. 2002. Inseminação artificial em caprinos. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 340p.
- Pellicer-Rubio M.T., Magallon T., Combarous Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57:1023-1031.
- Purdy P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum. Res.* 63(3): 215-225.
- Ritar A.J., Salamon S. 1982. 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.* 35: 305-312.
- Rodrigues B.A. 1997. Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 176p.
- Rovay H. 2006. Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 56p.
- Roy A. 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 179: 318-319.
- Santos A.D.F., Torres C.A.A., Jeferson F.F., Borges A.M., Guimarães J.D., Costa E.P., Rovay H. 2006. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Rev. Bras. Zootec.* 35(5): 1934-1942.
- Silva A.F., Costa E.P., Oliveira F.A., Torres C.A.A., Hass G.T.S., Nascimento V.A. 2006. Uso da dimetil-formamida associada ou não com glicerol na criopreservação de sêmen caprino. *Rev. Bras. Zootec.* 36(2): 452-456.
- Singh M.P., Sinha A.K., Singh B.K. 1995. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1047-1053.
- Souza A.F., Guerra M.M.P., Coletto Z.F., Mota R.A., Silva L.B.G., Leão A.E.D.S., Sobrinho E.S.N. 2006. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43:329-336.
- Traldi, A.S. Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – Manual técnico. Texto apostilado, 1994.

Traldi A. S. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: FEINCO 3, 2006.

Tuli R.K., Holtz W. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42: 547-555.

Tuli R.K., Schmidt-Baulain R., Holtz W. 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 25: 125-131.

Watson P.F. 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 1: 183-350.

Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.

Yamashiro H., Wang H. Yamashita Y., Kumamoto K., Terada T. 2006. Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *J. Reprod. Devel.* 52:407-414.