

CARACTERÍSTICAS *IN VITRO* E FERTILIDADE DO SÊMEN CAPRINO ARMAZENADO A 5°C POR 24 HORAS UTILIZANDO DUAS CONCENTRAÇÕES DE GEMA DE OVO NO DILUENTE

CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO¹, GUILHERME PUGLIESI², MILLER PEREIRA PALHÃO³, POLYANA GALVÃO BERNARDES COELHO², PEDRO GAMA KER², MARCELO TEIXEIRA RODRIGUES⁴, GIOVANNI RIBEIRO CARVALHO⁴

¹ Professor do Instituto Federal Minas Gerais - Campus São João Evangelista, MG - charles_bispo@yahoo.com

² Pós-graduando da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

³ Pós-Doutorando. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

⁴ Professor do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar, por meio de testes *in vitro* e a fertilidade *in vivo*, duas concentrações de gema de ovo (20% e 2,5%) em diluente citrato-gema de ovo na preservação do sêmen caprino armazenado a 5°C, por 24 horas. Foram realizadas 90 coletas de sêmen de quatro bodes. O sêmen foi diluído em diluente citrato-gema de ovo com duas concentrações de gema de ovo (T1 = 20% ou T2 = 2,5%) e armazenados em geladeira a 5°C, por 24 horas, até a realização das avaliações e inseminações. Os valores médios referentes ao sêmen resfriado foram, respectivamente, para T1 e T2: motilidade total, 68,5 ±

15,4 e 78,0 ± 5,5 ($p < 0,05$); vigor, 2,5 ± 0,6 e 3,2 ± 0,3 ($p < 0,05$); supravital, 59,4 ± 17,2 e 71,1 ± 10,5 ($p < 0,05$) e hiposmótico, 42,2 ± 15,7 e 56,2 ± 11,5 ($p < 0,05$). As taxa de fertilidade obtida no T1 (31,3%) foi maior em relação ao T2 (66,7%) e a prolificidade não diferiu ($p < 0,05$) entre o T1 (1,3 ± 0,5) e o T2 (1,4 ± 0,5). Conclui-se que o diluente de citrato-gema de ovo com baixa concentração de gema (2,5%) foi mais eficaz em preservar a viabilidade e a fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5°C, por 24 horas.

PALAVRAS-CHAVE: bode; diluente; espermatozoide; inseminação artificial; sêmen.

IN VITRO CHARACTERISTICS AND FERTILITY OF GOAT SEMEN COOLED AT 5°C FOR 24 HOURS USING TWO EGG YOLK CONCENTRATIONS IN SEMEN EXTENDER

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate by *in vitro* tests and *in vivo* fertility, two concentrations of egg yolk (T1 = 20% or T2 = 2.5%) in egg yolk-citrate semen extender for storing goat semen at 5°C for 24 hours. Ninety semen collections were performed in four goats. The semen was split and diluted in two different semen extenders and stored in refrigerator at 5°C for 24 hours, until the semen evaluation and insemination procedures. The average values for cooled semen, respectively, for T1 and T2 were motility, 68.5 ± 15.4 and 78.0 ± 5.5 ($p < 0.05$); vigor, 2.5

± 0.6 and 3.2 ± 0.3 ($p < 0.05$), supravital test, 59.4 ± 17.2 and 71.1 ± 10.5 ($p < 0.05$) and hypoosmotic test, 42.2 ± 15.7 and 56.2 ± 11.5 ($p < 0.05$). The fertility rate was greater ($p < 0.05$) in T1 (31.3%) than in T2 (66.7%) and the prolificacy did not differ ($p < 0.05$) between T1 (1.3 ± 0.5) and T2 (1.4 ± 0.5). In conclusion, the egg yolk-citrate extender with a low concentration (2.5%) of egg yolk was more effective in preserving the viability and fertility of goat semen stored at 5°C for 24 hours.

KEYWORDS: artificial insemination; extender; goat; semen; spermatozoa.

INTRODUÇÃO

No Brasil, verifica-se limitada utilização da inseminação artificial em caprinos em comparação a outras espécies de animais domésticos, como a espécie bovina (MACHADO & SIMPLICIO, 1995). Entre os fatores responsáveis pela baixa utilização podem ser citados a baixa disponibilidade de sêmen, o reduzido número de reprodutores submetidos aos testes de progênie, a falta de estrutura para comercialização e transporte adequado do sêmen e, principalmente, as dificuldades no processo de congelamento, que ainda apresentam índices de concepção insatisfatórios (RITAR & SALAMON, 1983; KARATZAS et al., 1997). Por outro lado, o elevado preço de compra e manutenção de um reprodutor caprino, as restrições envolvendo a importação de animais e de sêmen congelado, o elevado dano causado às células espermáticas no congelamento e, conseqüentemente, a baixa viabilidade espermática (SINGH & PURBEY, 1996; LÉBOUF et al., 2000) são fatores que justificam a difusão do resfriamento do sêmen caprino. Além disso, a viabilidade do sêmen caprino resfriado e armazenado facilita o transporte do material genético entre propriedades, podendo-se obter taxas de concepção acima de 70% quando utilizado sêmen resfriado a 5°C, por até 36 horas (ROCA et al., 1997).

A maioria dos diluentes de sêmen de mamíferos utiliza de 10 a 20% de gema de ovo junto a outros constituintes. As lipoproteínas de baixa densidade presentes na gema de ovo interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (BERGERON & MANJUNATH, 2006), conferindo proteção a essas células durante o processo de resfriamento (HOLT, 2000). Dentre essas lipoproteínas, a lecitina favorece a estabilidade da membrana celular dos espermatozoides contra o choque térmico durante o processo de resfriamento e congelamento (WATSON, 1995).

Os caprinos possuem a peculiaridade de secretar, juntamente com a secreção líquida oriunda das glândulas bulbouretrais, uma enzima coaguladora da gema de ovo que, em contato com esse ingrediente presente na maioria dos diluentes, resulta por hidrólise em lisofosfatidilcolinas, que são tóxicas aos espermatozoides (IRITANI & NISHIKAWA, 1963). Como possível solução desse problema, RITAR & SALAMON (1982) propuseram utilizar no diluente 1,5% de gema de

ovo na sua concentração final e obtiveram resultados satisfatórios comparados a concentrações de gema de ovo superiores. EVANS & MAXWELL (1987) recomendaram 2,5% de gema de ovo no total do volume do diluente devido à superioridade em relação à concentração de 20%. BISPO (2005) avaliou, *in vitro*, o sêmen caprino diluído em citrato-gema de ovo em duas concentrações de gema (20% e 2,5%) e resfriado a 5°C durante 48 horas, observando que o diluente com baixa concentração de gema de ovo (2,5%) foi o que melhor preservou a qualidade *in vitro* do sêmen durante as 48 horas de armazenamento. Entretanto, não se sabe se tal superioridade obtida na viabilidade seminal pode ser estendida ao potencial fertilizante do sêmen caprino.

Objetivou-se com este trabalho avaliar, por meio de testes *in vitro* e da fertilidade *in vivo*, o efeito de duas concentrações de gema de ovo (20% e 2,5%) no diluente citrato-gema de ovo (MIES FILHO, 1987) na preservação do sêmen caprino armazenado a 5°C, por 24 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Caprinos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, durante a estação reprodutiva fisiológica (março a junho de 2007).

Foram utilizados quatro reprodutores caprinos adultos das raças Alpina (n = 2) e Saanen (n = 2), mantidos em baias individuais, utilizados em estações reprodutivas anteriores e submetidos ao exame andrológico de acordo com as normas estabelecidas pelo CBRA (1998). Os animais receberam alimentação volumosa composta de silagem de milho, concentrado proteico e mistura mineral, atendendo às exigências nutricionais da espécie.

Coletas de sêmen foram realizadas todos os dias em dois reprodutores no período da manhã e em dois à tarde, um de cada raça (Saanen e Alpina), de modo que a cada 12 horas sempre tivessem no banco de sêmen doses com 24 horas de armazenamento disponíveis para a realização das inseminações. O método de coleta foi o da vagina artificial, de acordo com MEMON et al. (1986). Após a coleta, foram realizadas as avaliações macroscópicas (volume, aspecto e odor) e microscópicas quanto aos aspectos físicos (motilidade e vigor), realizadas por dois técnicos

(em duplo cego), coloração supravital com eosina-nigrosina e o teste hiposmótico (HO).

Para a coloração supravital, amostras de 10 µL do sêmen fresco e resfriado foram adicionadas na proporção de 1:1 com solução de eosina-nigrosina em lâmina previamente aquecida a 37°C. Após 30 segundos, foi realizado o esfregaço e avaliaram-se 100 espermatozoides em cada amostra para identificação da porcentagem de espermatozoides viáveis (não corados) e não viáveis (corados de rosa-claro ou de coloração avermelhada) (SMITH & MURRY, 1997) com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 40 vezes (SWANSON & BEARDEN, 1951).

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

Após a avaliação física do sêmen fresco, as

amostras seminais foram divididas em dois volumes iguais e, em seguida, cada alíquota foi diluída na proporção de 1:1 (sêmen:diluyente), de acordo com o tratamento proposto (T1 ou T2), como apresentado na Tabela 1. As concentrações espermáticas de cada alíquota foram determinadas com o auxílio de câmara Neubauer e completadas com o volume de diluidor necessário para a concentração final de 200×10^6 de espermatozoides por mL. O sêmen foi acondicionado em palhetas de 0,5 mL, resultando em 100×10^6 de espermatozoides totais/dose inseminante. Após o envase, as palhetas foram resfriadas em geladeira, utilizando-se a curva de resfriamento e o método proposto por BISPO (2005), e mantidas a 5°C.

Após 24 horas de armazenamento a 5°C, o sêmen foi novamente avaliado *in vitro* (motilidade total, vigor, teste supravital e teste HO) e as inseminações das cabras que foram detectadas em estro 12 horas antes foram realizadas. As fêmeas foram detectadas em estro por meio de rufiações realizadas duas vezes ao dia (06:00 e 18:00 horas), com o auxílio de um bode com translocação peniana cirúrgica e libido comprovada. O rufião foi levado à presença das fêmeas a fim de detectar o início do estro, caracterizado pela aceitação da monta pelas fêmeas. As rufiações ocorreram até a fêmea não mais aceitar a monta.

Tabela 1 - Composição dos meios diluentes utilizados nos tratamentos T1 e T2

	T1 (MIES FILHO, 1987)	T2 (MIES FILHO, 1987, modificado por BISPO, 2005)
Citrato de sódio mono-hidratado	2,9 g	2,9 g
Gema de ovo	20,0 mL	2,5 mL
Penicilina	1×10^6 UI	1×10^6 UI
Estreptomicina	1,0 g	1,0 g
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL	100 mL
Osmolaridade	423 mOsm/Kg	412 mOsm/Kg

Para realizar as inseminações, fêmeas em idade reprodutiva e em estro natural, das raças Saanen e Alpina (n=68), foram utilizadas. Trinta e duas fêmeas foram inseminadas com o sêmen do tratamento T1 (20% de gema de ovo) e 36 com o sêmen do tratamento T2 (2,5% de gema de ovo) após um período de armazenamento do sêmen a 5°C, por 24 horas. As inseminações foram realizadas utilizando-se a via transcervical (MIES FILHO, 1987). Nesse procedimento foi utilizado

aplicador universal para caprinos (Minitub®) e bainha de revestimento (Minitub®) de ponta excêntrica.

Cada fêmea foi inseminada uma única vez 12 horas após a detecção de cio. A inseminação foi realizada colocando-se a fêmea de cabeça para baixo e apoiada sobre um cavalete apropriado, facilitando, assim, o posicionamento da genitália feminina para realização da inseminação. Com o auxílio de um espéculo tipo bico de pato e de uma

fonte de luz, foram visualizados a entrada da cérvix e o aspecto do muco. O aspecto do muco cervical foi classificado como 1 - cristalino, 2 - estriado e 3 - caseoso (EVANS & MAXWELL, 1987). Logo após a inseminação, foi anotado o local de deposição do sêmen, em que 1- cervical superficial; 2 - cervical profunda; e 3 - intrauterina. O diagnóstico de gestação foi efetuado aos 30 dias pós-inseminação, com o auxílio de aparelho ultrassonográfico (Aloka SSD 500) equipado com transdutor linear de 5,0 MHz, por via transretal. No momento do diagnóstico também realizou-se a quantificação fetal, para posterior quantificação da prolificidade.

Para a análise estatística, os dados paramétricos, referentes à qualidade do sêmen, como motilidade, reativos ao teste hiposmótico (HO), viáveis pelo teste supravital e prolificidade, que não seguiram a distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, foram transformados para log e avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste SNK quando comparadas mais de duas médias para o mesmo parâmetro. Utilizou-se o programa SAEG 9.0 (UFV, 2005). Os dados

qualitativos não paramétricos (taxa de gestação) foram testados pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às características físicas e qualitativas do sêmen fresco estão apresentados na Tabela 2. Quanto ao volume e à concentração espermática do sêmen, os valores médios observados para os bodes 3 e 4 encontraram-se um pouco abaixo dos valores recomendados para a espécie caprina (CBRA, 1998) e das características seminais desses animais antes do período experimental. Tais resultados podem ser oriundos da avançada idade dos dois animais (7 e 9 anos) em relação aos demais e do desgaste fisiológico provocado pela coleta sequencial de sêmen. Entretanto, a média obtida para motilidade total (87,9%) e vigor (3,9), considerando os quatro animais em conjunto, apresentaram-se dentro dos padrões aceitáveis para caprinos.

Tabela 2 - Valores médios e desvio-padrão para características físicas e qualitativas do sêmen fresco de bodes das raças Saanen e Alpina

Característica seminal	Animal				Total
	1	2	3	4	
Ejaculados (n)	23	23	22	22	90
Volume (mL)	0,8 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,3 ^{ab}	0,7 ± 0,2 ^{ab}	0,6 ± 0,2 ^b	0,7 ± 0,3
Motilidade total (%)	88,4 ± 2,7 ^{ab}	87,8 ± 2,9 ^{ab}	86,3 ± 3,5 ^b	89,0 ± 3,6 ^a	87,9 ± 3,3
Vigor (0-5)	3,9 ± 0,3 ^a	4,0 ± 0,3 ^a	3,8 ± 0,3 ^a	4,0 ± 0,3 ^a	3,9 ± 0,3
Espermatozoides totais (x10 ⁹)	1,6 ± 0,8 ^a	1,3 ± 0,6 ^a	1,1 ± 0,5 ^a	1,2 ± 0,5 ^a	1,3 ± 0,6
HO (%)	76,3 ± 8,0 ^a	74,6 ± 7,4 ^a	67,7 ± 7,1 ^b	72,1 ± 6,4 ^{ab}	72,7 ± 7,8
Supravital (%)	74,6 ± 7,4 ^c	69,5 ± 5,6 ^d	82,2 ± 7,1 ^b	87,0 ± 5,9 ^a	78,2 ± 9,3

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

O sêmen fresco apresentou em média 72,7% de espermatozoides reativos ao teste HO. Esse valor foi superior aos obtidos por BITTENCOURT et al. (2005), SANTOS et al. (2006) e CASTILHO (2009), que evidenciaram 53,9%, 52% e 70,2% de espermatozoides caprinos reativos ao teste HO, respectivamente. Os valores médios obtidos de espermatozoides viáveis pela coloração supravital (78,2%) foram similares aos registrados por ROVAY (2006) e CASTILHO (2009), avaliando o sêmen fresco de bodes das mesmas raças utilizadas neste estudo. Esses resultados indicam que o sêmen fresco obtido no

presente estudo se encontra dentro dos padrões adequados do teste HO para espécie caprina, portanto, apto a ser submetido ao processo de refrigeração.

Os resultados observados para o sêmen resfriado estão sumariados na Tabela 3. Após o período de 24 horas, o sêmen submetido ao tratamento T1 (20% de gema de ovo) apresentou resultados inferiores quanto às características de motilidade total, vigor, integridade da membrana (supravital) e funcionalidade da membrana (teste hiposmótico-HO), quando comparados ao sêmen submetido ao tratamento T2 (2,5% de gema de

ovo). Esses valores confirmam a recomendação realizada por EVANS & MAXWELL (1987), que sugerem a utilização de 2,5% de gema de ovo ao volume total do diluente de sêmen de caprinos, a fim de evitar a ação da fosfolipase A2 sobre os componetes lipídicos da gema de ovo, promovendo a formação por hidrólise de lisofosfatidilcolinas, que são tóxicas aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO et al., 1997).

Tabela 3 - Características físicas e qualitativas do sêmen caprino diluído em diluente de citrato-gema de ovo com 20% (T1) ou 2,5% (T2) de gema de ovo e armazenado a 5°C, por 24 horas

	Tratamento	
	20% de gema de ovo	2,5% de gema de ovo
Motilidade total (%)	68,5 ± 15,4 ^b	78,0 ± 5,5 ^a
Vigor (0-5)	2,5 ± 0,6 ^b	3,2 ± 0,3 ^a
Íntegros pelo supravital (%)	59,4 ± 17,2 ^b	71,1 ± 10,5 ^a
Reativos pelo HO (%)	42,2 ± 15,7 ^b	56,2 ± 11,5 ^a

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

Os valores obtidos para motilidade total e vigor espermático do sêmen resfriado no presente estudo são superiores aos valores registrados em estudos anteriores quando o sêmen foi resfriado em diluidor Tris com 20% de gema (SINGH & PURBEY 1996) e em diluidor com baixa concentração de gema de ovo (SIQUEIRA et al. 2009a; 2009b). LEBOEUF et al. (2000) relataram que a maioria dos estudos relacionados à preservação do sêmen não lavado e resfriado apresenta viabilidade e fertilidade por até 5-8 horas. Esses autores também descreveram que períodos de armazenamento mais longos, como 12 ou 24 horas, resultam em baixa taxa de viabilidade, contrário ao que foi observado no presente estudo, como indicado pelos resultados para os parâmetros de motilidade total e vigor espermáticos nos dois tratamentos.

Quanto aos valores médios para coloração supravital (Tabela 3), o tratamento T1 apresentou menor média de espermatozoides viáveis após as 24 horas de resfriamento. Neste contexto, pode-se verificar que o diluente contendo 2,5% de gema de ovo preservou melhor a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides mantidos sob resfriamento, o que corrobora a recomendação de EVANS & MAXWELL (1987). Resultados superiores a 80% de células íntegras foram registrados por BISPO (2005), no mesmo tempo de armazenamento. No teste HO foi também verificada a superioridade do tratamento T2 em relação ao tratamento T1 (Tabela 3) na preservação do sêmen caprino mantido e resfriado

a 5°C, por 24 horas. PALHÃO (2006), utilizando animais das mesmas raças, obteve uma variação entre 51,8 a 88,2% de células reativas ao teste HO. Os resultados do teste supravital e do teste HO em conjunto indicam que o diluente de citrato-gema de ovo com 2,5% de gema de ovo em sua constituição preserva melhor a integridade da membrana plasmática do espermatozoide caprino em relação ao mesmo diluente com 20% de gema de ovo. Vale salientar que o teste HO, assim como o teste supravital, são testes complementares e que não devem ser analisados de forma isolada através de um único teste para se estimar o potencial fecundante de uma amostra seminal e sim de forma conjunta com os outros testes complementares de avaliação espermática (MOCÉ & GRAHAM, 2008).

Os valores médios e desvios-padrão para local de deposição do sêmen, aspecto do muco, peso das fêmeas, escore de condição corporal e duração do estro (horas) estão expressos na Tabela 4. Não houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos. A maioria das inseminações foi realizada intrauterinamente e quando o muco estava com aspecto estriado. Tais resultados sugerem que o sêmen foi depositado no local e momento mais adequado para a espécie caprina em cada um dos dois tratamentos, o que auxilia na obtenção de uma melhor fertilidade do sêmen utilizado. Em relação à duração do estro, os valores obtidos no presente estudo estão de acordo com os padrões para a espécie caprina (DORADO et al., 2007).

Tabela 4 - Parâmetros com relação ao local de deposição do sêmen, aspecto do muco, peso, escore corporal e duração do estro em cabras inseminadas com sêmen caprino diluído em diluente de citrato-gema de ovo com 20% (T1) ou 2,5% (T2) de gema de ovo e armazenado a 5°C, por 24 horas

Parâmetros	Tratamento	
	20% de gema de ovo	2,5% de gema de ovo
Local (1-3)	2,7 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,2 ^a
Muco (1-3)	2,1 ± 0,3 ^a	2,0 ± 0,4 ^a
Peso (kg)	48,5 ± 8,2 ^a	49,2 ± 8,0 ^a
Escore (1-5)	3,0 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,4 ^a
Duração do estro (horas)	33,3 ± 9,1 ^a	28,8 ± 8,5 ^a

Local: (1) cervical superficial; (2) cervical profunda; e (3) intrauterina.

Muco: (1) cristalino; (2) estriado; e (3) caseoso.

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

A taxa de gestação obtida com o sêmen submetido ao tratamento T2 foi maior do que com o tratamento T1 ($p < 0,05$), conforme observado na Tabela 5. Dessa forma, os presentes resultados indicam que o sêmen caprino, quando conservado por meio do resfriamento com diluente de citrato-gema de ovo contendo baixo percentual (2,5%) de

gema de ovo em sua constituição, apresenta características favoráveis à manutenção das células espermáticas e de seu potencial fecundante, favorecendo, assim, uma maior taxa de gestação em cabras inseminadas 12h após o início do estro com sêmen resfriado a 5°C por 24 horas.

Tabela 5 - Taxa de gestação aos 30 dias e prolificidade de cabras inseminadas com sêmen diluído em diluente de citrato-gema de ovo com 20% (T1) ou 2,5% (T2) de gema de ovo e armazenado a 5°C, por 24 horas

	Tratamento	
	20% de gema de ovo	2,5% de gema de ovo
Cabras inseminadas	32	36
Taxa de gestação (%)	31,3 ^a	66,7 ^b
Prolificidade	1,3 ± 0,5 ^a	1,4 ± 0,5 ^a

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

SIQUEIRA et al. (2009b) inseminaram 62 fêmeas da raça Toggenburg com sêmen armazenado em diluente tris-frutose-gema de ovo a 2,5% e resfriado a 5°C, por 24 horas, e obtiveram 42,9% de taxa de concepção com uma única inseminação. Esses resultados foram superiores aos do tratamento T1 e inferiores aos do tratamento T2. Contudo, a dose inseminante utilizada por esses autores (150 x 10⁶ spz/dose) foi superior à do presente estudo (100 x 10⁶ spz/dose). Resultados superiores aos obtidos neste trabalho foram descritos por ROCA et al. (1997), que utilizaram sêmen de bodes da raça Murciana preservado em diluente tris-gema com 2% de gema de ovo e resfriado a 5°C. Esses autores obtiveram uma taxa de concepção de 73,5% (n = 84 fêmeas) utilizando-se duas inseminações, o que justifica a elevada taxa de gestação, devido à

possibilidade de inseminar em um momento mais próximo da ovulação. No entanto, no presente estudo, foi realizada apenas uma inseminação 12 horas após o início do estro. Outro fator a ser considerado é que esses autores utilizaram concentrações espermáticas por dose inseminante também superiores (240 x 10⁶ spz/dose) às do presente estudo.

O resultado de fertilidade obtido com o tratamento T2 (2,5 % de gema de ovo) está dentro das taxas de gestação recomendadas por CORTEEL (1971) e ROCA et al., (1997). Esses autores relataram valores variando de 61 a 87% de gestação, após uma única inseminação realizada entre 12-24 horas após o início do estro, mesmo período utilizado para as realizações das inseminações e mesmo número de inseminações realizadas por cabra

em estro no estudo aqui descrito. Os resultados indicaram que a fertilidade obtida no presente estudo, quando se utilizou o diluente de citrato-gema de ovo com 20% de gema de ovo, foi inferior aos padrões aceitáveis para a espécie caprina.

CONCLUSÃO

Em conclusão, constata-se que o diluente citrato-gema na concentração de 2,5% de gema de ovo em sua constituição preserva melhor a viabilidade do sêmen caprino resfriado a 5°C, durante 24 horas e proporciona fertilidade superior à do mesmo diluente constituído com 20% de gema de ovo. Constata-se ainda que, com a utilização do diluente citrato-gema na concentração de 2,5% de gema de ovo, o sêmen caprino pode ser utilizado na sua totalidade, sem a necessidade da retirada do plasma seminal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do Professor Dr. Alan Maia Borges da Universidade Federal de Minas Gerais com a avaliação da osmolaridade dos diluentes seminais e ao CNPq por disponibilizar a bolsa de doutorado ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

BERGERON, A., MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BISPO, C. A. S. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005. Disponível em: <http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/TeseBispoSemen.PDF>.

BITTENCOURT, R.; RIBEIRO FILHO, A.; SANTOS, A.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.; VASCONCELOS, M.; LEANDRO, E.; GUIMARÃES, J. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 213-218, 2005.

CASTILHO, E. F.; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; ESPESCHIT, C. J. B. Uso da propólise e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2335-2345, 2009.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO

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

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

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p. 168-177, 2007.

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

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F.; et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 436-438, 2001.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-23, 2000.

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

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

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

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

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

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

MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-108, 2008.

PALHÃO, M. P.; BISPO, C. A. S.; FURST, R.; ROVAY, H.; CARVALHO, G. R.; BISPO, M. S. Efeito de diferentes curvas de resfriamento e diluentes na conservação do sêmen caprino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 571-571, 2006.

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

- 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. **Australian Journal of Biology Science**, v. 35, p. 305-312, 1982.
- RITAR, A. J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. **Australian Journal of Biology Science**, v. 36, n. 1, p. 49-59, 1983.
- ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Ruminant Research**, v. 25, p. 147-153, 1997.
- ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/2/TDE-2007-02-08T131851Z-372/Publico/texto%20completo.pdf.
- SANTOS, M. H. B.; MORAES, E. P. B. X.; GUIDO, S. I.; BEZERRA, F. Q. G. B.; MELO, A. N.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Fetal sexing in Santa Inês ewes by ultrasonography. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 573-578, 2006.
- SINGH, L. P.; PURBEY, L. N. Preservability of goat spermatozoa in Tris and Citrate extenders at -196° C and 5° C. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 66, n. 11, p.1139-1141, 1996.
- SIQUEIRA, A. P.; 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. Taxa de concepção de cabras inseminadas com semen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 66-71, 2009a.
- SIQUEIRA, A. P.; FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M.; PALHARES, M. C. M.; BRUSCHI, M. C. M.; PEIXOTO, M. P. Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema-de-ovo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 299-305, 2009b.
- SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Staining techniques in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 57, p. 246-250, 1997.
- SWANSON, W. W.; BEARDEN, H. J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 981-987, 1951.
- UFV. **SAEG versão 9.0**. Viçosa-MG: UFRV, 2005.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

Protocolado em: 04 fev. 2011 Aceito em: 13 out.2011