

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS DILUÍDOS E CONGELADOS EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-101) OU TRIS, CORADOS POR EOSINA-NIGROSINA E AZUL DE BROMOFENOL*

RODRIGO VASCONCELOS DE OLIVEIRA,¹ JOSÉ FERREIRA NUNES,² CRISTIANE CLEMENTE DE MELLO SALGUEIRO,³ JOSÉ MAURÍCIO MACIEL CAVALCANTE,⁴ ARLINDO ALENCAR DE ARARIPE MOURA⁵ E AIRTON ALENCAR DE ARAÚJO⁶

1. Médico veterinário, mestre em Ciências Veterinárias, PPGCV/UECE. E-mail: rodrigovetbio123@yahoo.com.br

2. Médico veterinário, Ph.D em Fisiologia da Reprodução, professor titular da FAVET/UECE, Laboratório de Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino, UECE

3. Médica veterinária, doutora em Ciências Veterinárias, PRODOC/CAPES, Laboratório de Tecnologia Sêmen Caprino e Ovino, UECE

4. Médico veterinário, mestrando em Ciências Veterinárias, PPGCV-UECE, Laboratório de Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino, PPGCV/UECE

5. Agrônomo, Ph.D em Fisiologia da Reprodução, professor adjunto, Departamento de Zootecnia, UFC

6. Médico veterinário, doutor em Ciências da Vida, professor adjunto, FAVET/UECE.

* Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a morfologia de espermatozoides caprinos frescos e congelados em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, bem como comparar a eficiência dos corantes azul de bromofenol (AB) e eosina-nigrosina (EN). Cada ejaculado foi dividido, diluído em ACP-101 e TRIS, congelado e, após trinta dias, descongelado. Analisou-se a morfologia espermática por esfregaços corados por EN e AB. Os parâmetros morfológicos foram: espermatozoides normais (N), alterações de cabeça (AC), de peça intermediária (API), de flagelo (AF), gotas citoplasmáticas proximal (GCP) e distal (GCD) e cabeça

destacada (CD). Não se verificou diferença de N entre tratamentos após cinco minutos do teste de termorresistência. Após 120 minutos, a quantificação de N foi influenciada pelo diluente, tendo o TRIS resultados superiores. O período de incubação afetou a morfologia espermática, aumentando as porcentagens de AC. Conclui-se que o meio à base de TRIS promoveu maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozoides caprinos. O corante AB demonstrou ser mais eficiente na avaliação do sêmen caprino fresco e pós-descongelamento.

PALAVRAS-CHAVES: Água de coco em pó, azul de bromofenol, caprinos, espermatozoides, TRIS.

ABSTRACT

MORPHOLOGIC EVALUATION OF GOAT SPERMATOOZOA DILUTED AND FROZEN IN MEDIA BASED ON POWDER COCONUT WATER (PCW-101) OR TRIS, STAINED BY EOSIN-NIGROSIN AND BROMOPHENOL BLUE

This aims of the work were: to evaluate *in vitro* the goat semen frozen in diluents media based on powder coconut water (PCW-101) and TRIS and, compare the bromophenol blue stain efficiency with the eosin-nigrosin stain. The ejaculateds were divided and diluted into PCW-

101 and TRIS, frozed and thawed after 30 days. Spermatic morphology was evaluated, through semen smears stained by eosin-nigrosin (EN) and bromophenol blue (BB). The morphologic parameters evaluated were: normal spermatooza (N), head alteration (HA), intermediary piece altera-

tion (IPA), tail alteration (TA), proximal cytoplasmic drop (PCD), distal cytoplasmic drop (DCD), and detached head (DH). There wasn't significant difference in the observation of N between media, staining and their interactions after 5 minutes of thermo resistance test. After 120, the N was significantly influenced by media, where the TRIS presen-

ted better results. The incubation period of 120 minutes at 37°C affect the spermatic morphology, increasing the HA percentages. The media based on TRIS promoted better protection from the cryoinjuries on frozen goat spermatozoa. BB staining was efficient on the fresh and post-thaw goat semen evaluation.

KEY WORDS: Bromophenol blue, goat, powder coconut water; TRIS, spermatozoa.

INTRODUÇÃO

A avaliação morfológica pode ser realizada por meio de preparação úmida e esfregaços corados (BEARDEN & FUQUAY, 1992). DERIVAUX (1980) relata que as anormalidades espermáticas podem afetar, isolada ou simultaneamente, as diferentes regiões da cabeça, peça intermediária e cauda.

Existe uma correlação média entre a morfologia espermática, particularmente quando presentes alterações acrossomais (FOOTE, 2003; CHENOWETH, 2005) e a fertilidade, entretanto é variável, sendo influenciada pela metodologia empregada na avaliação (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

A viabilidade espermática está relacionada com a integridade da membrana plasmática (EVANS & MAXWELL, 1990; CHEMINEAU, 1991), que pode ser avaliada por meio de colorações vitais (COLAS, 1980; DERIVAUX, 1980; BEARDEN & FUQUAY, 1992). Dentre os corantes utilizados, podem ser citados a eosina-nigrosina (DERIVAUX, 1980; EVANS & MAXWELL, 1990; CHEMINEAU, 1991; BEARDEN & FUQUAY, 1992), azul de tripan (BEARDEN & FUQUAY, 1992) e azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980; MIES FILHO, 1982; MEDEIROS, 2004).

Durante os processos de congelamento-descongelamento, os espermatozoides são submetidos a condições desfavoráveis (PARKS & GRAHAM, 1992) e, conseqüentemente, podem ocorrer danos à membrana plasmática e acrossoma (WATSON, 1995). O azul de bromofenol demonstrou ser um corante eficiente para avaliação do sêmen ovino (MEDEIROS, 2004). Entretanto, existe uma carência de trabalhos relacionados a sua utilização

para sêmen caprino.

Nesse sentido, este trabalho visa avaliar a morfologia de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meios diluentes à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS submetidos ao teste de termorresistência. Além disso, visa comparar a eficiência do corante azul de bromofenol com o corante clássico de eosina-nigrosina na avaliação morfológica do sêmen caprino fresco e descongelado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, no município de Fortaleza, Ceará, com latitude 03°43' Sul e longitude 38°30' Oeste, temperatura média anual de 27°C.

Utilizaram-se quatro bodes – dois da raça Saanen e dois da raça Boer. Os animais foram mantidos em confinamento, em baias individuais. A alimentação consistiu de feno de tifton (*Cynodon* sp.) e ração comercial com 18% PB e sal mineral e água à vontade.

Preparação dos diluentes

O diluente à base de água de coco em pó, com pH 6,8 e 300 mOsm/Kg para sêmen caprino, o ACP-101, era constituído por água de coco em pó acrescida de tampões, 100 mL de água destilada, 40 mg de gentamicina, 2,5% de gema de ovo e 7% de glicerol. Dividiu-se o diluente em duas frações: "A" sem glicerol e "B" com 14% glicerol (SALGUEIRO et al., 2003).

O diluente à base de TRIS, com pH 6,8 e 300 mOsm/Kg, era constituído por 3,786 g de TRIS

2,11 g de ácido cítrico, 100 mL de água destilada, 40 mg de gentamicina, 1% de frutose, 20% de gema de ovo e 6,8% de glicerol. O diluente foi dividido em duas frações: “A” sem glicerol e “B” com 13,6% de glicerol (SINGH et al., 1995).

Coleta e processamento seminal

O sêmen foi coletado na presença de uma fêmea em cio induzido por uma injeção prévia de benzoato de estradiol (Estrogin[®]), com 48 horas de antecedência ao procedimento, por meio de vagina artificial (IMV[®]) aquecida a 40°C-42°C e lubrificada com glicerina. A vagina artificial continha um cone de borracha, acoplado a um tubo coletor Falcon de 15 mL. A coleta de sêmen era realizada duas vezes por semana, perfazendo doze ejaculados por animal, totalizando 48 ejaculados. Após cada coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 30°C enquanto se realizou a avaliação seminal. Mensurou-se o volume do ejaculado (mL) por meio da observação direta do tubo coletor graduado.

A avaliação de motilidade massal (MM) foi realizada por meio de exame de uma gota de 5µL de sêmen puro em lâmina, previamente aquecida a 37°C, sob aumento de 100x em microscópio de contraste de fase, sendo classificada de 0 a 5 (CHEMINEAU et al., 1991).

Para avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis (PEM) e motilidade individual progressiva (MIP) (0-5), 10 µL de sêmen puro foram diluídos em 500 µL de solução fisiológica de NaCl a 0,9% mantida também no banho-maria a 30°C, sendo, logo após a homogeneização, conduzida uma alíquota 10µL a uma lâmina, previamente aquecida a 37°C, sob aumento de 400x em microscópio de contraste de fase – a PEM atribuída em valores de porcentagem e a MIP classificada de 0 a 5 (CHEMINEAU et al., 1991).

Após a avaliação da MM, PEM e MIP, cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas iguais, sendo então acondicionadas em tubos de ensaio de 15 mL. Estas alíquotas formaram dois tratamentos experimentais – ACP-101 e TRIS –, sendo submetidas a uma pré-diluição na taxa de 1:2 (sêmen:fração A diluente) (v/v), a 30°C.

A concentração espermática ($\times 10^9$ spz/mL) foi mensurada por meio do método de espectrofotometria, diluindo-se 10 µL de sêmen puro em 4 mL de solução de formaldeído a 0,1% (taxa de diluição 1:400 v/v) (SORENSEN, 1982).

Para a avaliação da morfologia espermática e porcentagem de espermatozoides vivos e mortos confeccionaram-se esfregaços de sêmen corados com eosina-nigrosina (COLAS, 1980) e azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980; MEDEIROS, 2004). Para tanto, uma gota de 30 µL do corante foi colocada em lâmina, previamente aquecida a 37°C, e com um pequeno bastão de plástico maciço com ponta levemente umedecida com sêmen puro procedeu-se à mistura com o corante, e após um repouso de dez segundos, utilizando-se uma lamínula, previamente aquecida a 37°C, formando um ângulo de 30° com a lamina, a gota contendo sêmen e corante foi tocada e estendida até a extremidade oposta, formando o esfregaço corado. Os esfregaços foram secos em chapa aquecida a 37°C e então avaliados em microscopia de contraste de fase sob aumento de 1.000x, em objetiva de imersão, quanto à porcentagem de espermatozoides vivos, mortos, normais e alterações de cabeça, peça intermediária, flagelo, gotas citoplasmáticas proximal e distal, e cabeça destacada.

Após a mensuração da concentração espermática de cada ejaculado, calculou-se a quantidade das frações A e B de cada diluente. Todos os grupos foram submetidos à segunda diluição a 30°C, pela adição do volume restante da fração “A” de cada diluidor. Posteriormente, levaram-se as amostras de sêmen diluído, acondicionadas em tubos de ensaio de 15 mL vedados com tampa de borracha, a um recipiente plástico contendo 200 mL de água a 30 °C. Refrigerou-se o conjunto em um *freezer* horizontal (Prosdócimo[®]), durante 120 minutos, até alcançar 4°C a uma velocidade média de refrigeração de 0,22°C/minuto. Monitorou-se a curva de refrigeração com um termômetro digital (HEADterm 200[®]).

Uma vez alcançados 4°C, realizou-se a terceira diluição adicionando-se o volume da fração “B”, previamente calculado, de cada diluente em três etapas, com intervalos de cinco minutos, até alcançar uma concentração final de 400×10^6

sptz/mL, com mais cinco minutos de tempo de equilíbrio.

O sêmen diluído e resfriado a 4°C, de todos os grupos, foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL (contendo cada uma 100×10^6 espermatozoides), previamente identificadas e refrigeradas a 4°C. Realizou-se o envase em uma estante dentro do *freezer* horizontal.

As palhetas, dos tratamentos ACP-101 e TRIS, com sêmen diluído e refrigerado a 4°C, foram colocadas em rampa de congelação, distante 3,5 cm do nível do nitrogênio líquido (N_2L), onde se congelaram nos vapores (-100°C) por um período de dez minutos, posteriormente sendo submersas em N_2L , a -196°C, acondicionadas em globetes fixados em *racks* identificadas, sendo então armazenadas em botijão criogênico.

Decorridos trinta dias após a congelação, retiraram-se do botijão criogênico amostras de palhetas para descongelação e avaliação. As palhetas foram imersas em banho-maria a 37°C durante trinta segundos. Descongeladas, as amostras foram acondicionadas em tubos Eppendorf® e mantidas a 37°C por 120 minutos, para realização do teste de termorresistência (CHEMINEAU et al., 1991; CBRA, 1998).

A morfologia espermática foi avaliada aos cinco e 120 minutos pós-descongelação, sob microscopia de contraste de fase, em aumento de 1.000x com objetiva de imersão, analisando-se lâminas de esfregaços de sêmen pós-descongelação, corados por eosina-nigrosina (COLAS, 1980) e azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980; MEDEIROS, 2004), como descrito anteriormente.

Para a análise estatística, os ejaculados foram considerados repetições para as variáveis estudadas. Depois de ser comprovada a distribuição normal das variáveis e de serem aplicadas as transformações necessárias, realizaram-se as provas de análise de variância de duas vias, tomando-se, como efeito fixo, diluente, corante e diluente \times corante e como efeitos variáveis os espermatozoides vivos e mortos, N, AC, API, AF, GCP, GCD e CD. Para a obtenção de diferenças significativas entre as médias, foi utilizado o teste “t” de Student para análise dos dados do sêmen fresco relacionados à integridade de membrana

e morfologia espermáticas entre corantes, e nos casos em que a análise de variância revelou efeito significativo, utilizou-se teste de Tukey para a comparação múltipla de médias para os dados referentes ao sêmen pós-descongelação, respectivamente. Os dados são apresentados como médias \pm desvio-padrão e se considerou significativa uma diferença de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros do sêmen fresco dos quatro bodes avaliados foram: volume, concentração espermática (Conc. Sptz), motilidade massal (MM), porcentagem de espermatozoides móveis (PEM) e motilidade individual progressiva (MIP) (Tabela 1). Todos os animais possuíam características seminais normais para a espécie, de acordo com o EVANS & MAXWELL (1990), CHEMINEAU et al. (1991) e CBRA (1998).

Os resultados obtidos com a avaliação da integridade de membrana e morfologia de espermatozoides caprinos frescos, em esfregaços corados com eosina-nigrosina e azul de bromofenol, confeccionados logo após a coleta por vagina artificial, estão representados nas Tabelas 2 e 3.

Não se verificou diferença significativa em relação à avaliação de integridade de membrana (vivos e mortos), espermatozoides normais e alterações de peça intermediária. Entretanto, as quantificações de alterações de cabeça, gota citoplasmática distal e cabeça destacada foram significativamente superiores nos esfregaços corados com eosina-nigrosina. Os esfregaços corados com azul de bromofenol demonstraram maior percentual de alterações de flagelo. O total de alterações morfológicas no sêmen fresco mostrou-se inferior ao limite de 15%, delimitado pelo CBRA (1998). A interação da maior sensibilidade na visualização das alterações de cabeça nos espermatozoides corados pela solução de eosina-nigrosina com a ordem de importância (AC>DPI>GCP>GCD>AF) relacionada à classificação das alterações pode ter promovido a diferença significativa relacionada à observação de alterações de flagelo entre os corantes.

TABELA 1. Parâmetros (média \pm dp) do sêmen fresco de quatro bodes

Bode	Volume (mL)	Conc. Sptz (10 ⁹ /mL)	MM (0-5)	PEM (%)	MIP (0-5)
1	0,78 \pm 0,21	5,41 \pm 0,54	3,83 \pm 0,54	81,25 \pm 6,44	3,71 \pm 0,45
2	0,74 \pm 0,23	5,53 \pm 0,42	3,79 \pm 0,45	82,50 \pm 3,37	3,50 \pm 0,37
4	0,57 \pm 0,11	5,47 \pm 0,40	4,08 \pm 0,47	87,92 \pm 3,96	4,00 \pm 0,43
5	0,69 \pm 0,28	4,35 \pm 0,88	3,42 \pm 0,36	82,08 \pm 3,96	3,71 \pm 0,45
Total	0,69 \pm 0,23	5,19 \pm 0,75	3,78 \pm 0,50	83,44 \pm 5,17	3,73 \pm 0,45

TABELA 2. Integridade de membrana de espermatozoides caprinos frescos, corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), logo após a coleta por vagina artificial

Corante	Vivos (não corados)	Mortos (corados)
EM	76,65 \pm 7,83	23,33 \pm 7,77
AB	76,21 \pm 0,74	23,79 \pm 8,88

p>0,05. Teste t de Student

TABELA 3. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos frescos, corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), logo após a coleta por vagina artificial

Corante	N	AC	API	AF	GCP	GCD	CD
EN	91,29 \pm 4,41	1,69 \pm 1,49 ^a	1,35 \pm 1,38	4,48 \pm 3,52 ^b	0,08 \pm 0,28	0,44 \pm 0,80 ^a	0,60 \pm 0,74 ^a
AB	90,29 \pm 4,46	0,67 \pm 0,97 ^b	1,42 \pm 2,36	7,35 \pm 3,61 ^a	0,13 \pm 0,49	0,00 \pm 0,00 ^b	0,13 \pm 0,33 ^b

Letras minúsculas entre linhas (p<0,05). Teste t de Student

N= normais; AC = alteração de cabeça; API = alteração de peça intermediária; AF = alteração de flagelo; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal; CD = cabeça destacada.

A porcentagem de espermatozoides mortos (corados), tanto pela eosina-nigrosina como pelo azul de bromofenol, foi superior aos achados de GUBARTALLAH et al. (2004), BARKAWI et al. (2005) e NUR et al. (2005), que encontraram valores de 9,2%, 12,7% e 15,49%, respectivamente, e inferiores aos 22% observados por ZAMIRI & HEIDARI (2006). O percentual do total de alterações morfológicas no sêmen fresco mostrou-se inferior ao limite de 15% delimitado pelo CBRA (1998) e semelhantes aos resultados obtidos por KARAGIANNIDIS et al. (2000), NUR et al. (2003), GUBARTALLAH et al. (2004), BARKAWI et al. (2005) e ZAMIRI & HEIDARI (2006), que observaram percentuais de defeitos totais no sêmen caprino fresco corado por eosina-nigrosina de 8,79; 9,10; 8,56; 13,5; e 9,85 %, respectivamente.

Os dados obtidos com a avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina e azul de bromofenol, após cinco minutos do teste de termorresistência, estão ilustrados na Tabela 4.

Não se verificou diferença significativa na porcentagem de espermatozoides normais, gota citoplasmática distal e cabeça destacada entre diluentes, corantes e suas interações. A identificação das alterações de cabeça foi significativamente inferior nos espermatozoides do tratamento ACP-AB, quando comparadas ao tratamento TRIS-AB. Ainda, no tratamento ACP-AB houve observações de alterações de peça intermediária, flagelo e gota citoplasmática proximal superiores aos tratamentos ACP-EN e TRIS-AB.

Os dados oriundos da avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com

eosina-nigrosina e azul de bromofenol, após 120 minutos do teste de termorresistência, estão ilustrados na Tabela 5.

TABELA 4. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), após cinco minutos do teste de termorresistência

Trat.	N	AC	API	AF	GCP	GCD	CD
ACP-EN	64,54±8,16	27,13±8,28 ^{ab}	1,06±1,19 ^b	5,85±3,41 ^b	0,10±0,31 ^b	0,29±0,80	0,96± 1,01
ACP-AB	62,96±9,09	24,92±8,24 ^b	2,35±2,28 ^a	8,38±4,45 ^a	0,31±0,55 ^a	0,27±0,82	0,77±0,99
TRIS-EN	61,79±9,80	31,25±9,72 ^a	0,92±1,16 ^b	5,35±3,33 ^b	0,00±0,00 ^b	0,04±0,20	0,99±0,89
TRIS-AB	60,94±7,48	31,48±7,39 ^a	1,23±1,17 ^b	5,00±3,89 ^b	0,21±0,46 ^b	0,42±0,99	0,69±0,90

Letras minúsculas entre linhas (p<0,05). Teste de Tukey

N = normais; AC = alteração de cabeça; API = alteração de peça intermediária; AF = alteração de flagelo; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal; CD = cabeça destacada.

TABELA 5. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meios à base de água de coco em pó (ACP-101) e TRIS, por meio de esfregaços corados com eosina-nigrosina (EN) e azul de bromofenol (AB), após 120 minutos do teste de termorresistência

Trat.	N	AC	API	AF	GCP	GCD	CD
ACP-EN	47,60±7,70 ^b	44,04±9,84 ^a	0,92±1,50 ^{ab}	6,10±4,42 ^b	0,06±0,24	0,17± 0,63	0,94± 1,24
ACP-AB	49,79±9,38 ^{bc}	38,69±8,36 ^b	1,52±1,25 ^a	8,94±4,54 ^a	0,15± 0,41	0,27± 0,82	0,63± 0,91
TRIS-EN	56,73±6,66 ^a	37,13±6,87 ^b	0,69±1,03 ^b	4,90±4,16 ^b	0,02± 0,14	0,13± 0,61	0,42± 0,65
TRIS-AB	52,88±9,22 ^{ac}	40,29±8,64 ^{ab}	0,92±1,07 ^{ab}	4,67±3,58 ^b	0,10± 0,37	0,27± 0,79	0,83± 1,08

Letras minúsculas entre linhas (p<0,05). Teste de Tukey

N = normais; AC = alteração de cabeça; API = alteração de peça intermediária; AF = alteração de flagelo; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal; CD = cabeça destacada.

Não foi observado efeito do corante sobre as constatações de alterações morfológicas nos espermatozoides diluídos e congelados no meio diluente à base de TRIS. As alterações relacionadas às gotas citoplasmáticas proximal e distal e à cabeça destacada não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Após 120 minutos do teste de termorresistência, a porcentagem de espermatozoides normais foi influenciada significativamente pelo diluente, tendo o meio diluente à base de TRIS apresentado resultados superiores.

As observações de alterações de cabeça foram influenciadas pelo diluente quando os esfregaços foram corados pela eosina-nigrosina,

tendo o ACP-101 apresentado valores superiores. A quantificação das alterações de flagelo foi significativamente superior no tratamento ACP-AB. Entretanto, SALGUEIRO (2003), avaliando *in vitro* espermatozoides caprinos congelados-descongelados em meio diluente à base de água de coco *in natura* e TRIS-gema-glicerol, não observou diferenças significativas relacionadas às alterações morfológicas.

As principais alterações morfológicas constatadas após descongelamento do sêmen relacionam-se às alterações de cabeça e flagelo. Observações semelhantes foram relatadas por SINGH et al. (1995) em espermatozoides caprinos diluídos e congelados-descongelados em diluente à base de

TRIS-gema-glicerol. HIDALGO et al. (2006), AZEREDO et al. (2001) e FERRARI & BARNABE (1999) observaram o efeito deletério da congelação do sêmen caprino sobre a porcentagem de defeitos acrossomais.

O período de incubação de 120 minutos a 37°C afetou a morfologia espermática, aumentando as porcentagens de alterações de cabeça em todos os tratamentos e alterações de cauda nos espermatozoides diluídos e congelados em ACP-101. Vale ressaltar que as principais alterações de cabeça observadas em todos os tratamentos, após a descongelação do sêmen, estavam relacionadas a defeitos no acrossoma.

A gema de ovo é um crioprotetor externo acrescentado aos diluentes seminais que visa a uma proteção não apenas relacionada aos danos oriundos do resfriamento (EVANS & MAXWELL, 1990; PURDY, 2005) como também às crioinjúrias produzidas pela etapa de congelação (ABOAGLA & TERADA, 2004). Comparando-se os diluentes empregados no presente estudo, observa-se uma maior quantidade de gema no meio à base de TRIS, diferença que pode ter gerado sua maior proteção às crioinjúrias.

O corante azul de bromofenol promoveu uma melhor avaliação dos espermatozoides, principalmente no discernimento das alterações de cabeça, pois corou menos o fundo da lâmina, diminuindo os artefatos. Essa ressalva também foi relatada por MEDEIROS (2004), que ainda demonstrou a eficiência do corante após o armazenamento a temperatura ambiente (30°C) por trinta dias, o que facilita sua utilização em exames andrológicos a campo.

Vale ressaltar que os esfregaços corados com eosina-nigrosina, oriundos de sêmen caprino diluído e congelado em meio diluente à base de TRIS apresentaram maior dificuldade na avaliação, em virtude do menor contraste entre o espermatozoide e o fundo da lâmina.

CONCLUSÕES

O meio diluente à base de TRIS promoveu uma maior proteção quanto às crioinjúrias em espermatozoides caprinos congelados.

O corante azul de bromofenol demonstrou ser mais eficiente na avaliação morfológica do sêmen caprino fresco e pós-descongelação.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPq, à FUNCAP e à FUNECE.

REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing steps of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, n. 1160-1172, 2004.
- AZEREDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 41, p. 257-263, 2001.
- BARKAWI, A. H.; ELSAYED, E. H.; ASHOUR, G.; SHEHATA, E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 66, p. 209-213, 2006.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied animal reproduction**. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. 478 p.
- CBRA. **Manual para exame e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 79 p.
- CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991. 222 p.
- CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 457-468, 2005.
- COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France II-étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition and Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1789-1799, 1980.
- DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Editora Acribia, 1980.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editora Acribia S.A., 1990. 192 p.

- FERRARI, S.; BARNABE, V. H. Effect of two kinds of diluents and two freezing methods on caprine semen quality. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 4, 1999.
- FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 75, p. 114-139, 2003.
- GUBARTALLAH, K.A. ; AMEL, A. A. ; BAKHIET, O ; BABIKER, A. Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen Bucks under the climatic conditions of Khartoum. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalab, v. 4, n. 11, p. 133-139, 2004.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri-SP: Manole, 2004. 513 p.
- HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometric using the sperm class analyzer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 996-1003, 2006.
- KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p. 1285-1293, 2000.
- MEDEIROS, A. A. **Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino**. Fortaleza, 2004. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, 2004.
- MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRÃO, R.N. Congelamento do sêmen ovino na primavera. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 5, p. 27-57, 1982.
- NUR, Z.; GÜNAY, Ü.; DOGAN, I.; BASPNAR, B.; SOYLU, M. K. Evaluation of goat semen morphology after different staining methods. **Veteriner Fakültesi Dergisi**, Bursa, v. 22, n. 1, 39-43, 2003.
- NUR, Z.; DOGAN, I.; GUNAY, U.; SOYLU, M.K. Relationship between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goats. **Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 49, p. 183-187, 2005.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 32, p. 209-222, 1992.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: CBRA, 2005. Palestras.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M. A.; MAGALHÃES, D. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; PÁACIO, A.R.S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento por meio do Teste Hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 377-378, 2003.
- SINGH, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 1047-1053, 1995.
- SORENSEN JR., A.M. **Reproducción animal: principios y prácticas**. México: Ed. McGraw-Hill, 1982. 302 p.
- ZAMIRI, M.J.; HEIDARI, A.H. Reproductive characteristics of Raylini male goats of Kerman province in Iran. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 96, p. 176-185, 2006.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, Paris, v. 7, p. 871-891, 1995.

Protocolado em: 7 nov. 2007. Aceito em: 19 maio 2008.