

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN CAPRINO RESFRIADO, COM OU SEM CENTRIFUGAÇÃO DO PLASMA SEMINAL E DILUÍDO EM LEITE DESNATADO-GLICOSE E TRIS-GEMA DE OVO

ANA KARINA SARAIVA VIANA,¹ MARCOS CHALHOUB,² ANTÔNIO DE LISBOA RIBEIRO FILHO,² ANA KARINE ALMEIDA,³ ANA PAULA MOTA PORTELA,³ RODRIGO FREITAS BITTENCOURT,³ SIDNEY GONÇALVES GONZALEZ ALVES,³ THEREZA CRISTINA CALMON DE BITTENCOURT⁴ E ALINE TRINDADE QUINTELA³

1. Mestre em Medicina Veterinária Tropical da Universidade Federal da Bahia UFBA, karinasaraiva@ig.com.br.

2. Departamento de Patologia e Clínicas da Escola de Medicina Veterinária (EMV) UFBA.

3. Alunos de pós-graduação da EMV/UFBA.

4. Departamento de Produção Animal da EMV/UFBA

Departamento de Patologia e Clínicas EMV/UFBA – CEP 40.170-110 – Salvador, Bahia

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar *in vitro* quatro tratamentos para o resfriamento de sêmen caprino, a partir de 32 ejaculados de quatro bodes, submetidos aos diluidores tris-gema de ovo e leite desnatado-glicose, e processados com ou sem centrifugação do plasma seminal. O sêmen foi resfriado e conservado a 4° C durante 48 horas. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e submetidos a ANOVA ($P < 0,05$) para a análise estatística (SPSS – versão 11.0). Nas amostras leite desnatado-glicose sem (T1) e com (T2) centrifugação e tris-gema de ovo sem (T3) e com (T4) centrifugação, após 48 horas de resfriamento, obtiveram-se as médias de 33,00; 30,68; 40,62 e 46,78 para

motilidade (%) e de 2,23; 2,34; 2,65 e 3,25 para vigor (0-5). Quanto às patologias de acrossoma (%) e de cauda (%), após 48 horas de conservação a 4° C, obtiveram-se as seguintes médias: 5,16; 5,94; 3,81; 4,47 e 16,25; 12,38; 15,34; 11,47, respectivamente, para as amostras T1, T2, T3 e T4. Os diferentes tratamentos não alteraram o pH ($p > 0,05$). Conclui-se que o diluidor tris-gema de ovo preservou melhor ($p < 0,05$) a motilidade, o vigor e a patologia de acrossoma, do que o leite desnatado-glicose. A remoção do plasma seminal, por sua vez, não influenciou ($p > 0,05$) as características seminais avaliadas, exceto em relação à patologia de cauda.

PALAVRAS-CHAVE: Caprino, centrifugação, diluidor, resfriamento, sêmen.

ABSTRACT

EVALUATION *IN VITRO* OF COOLED GOAT SEMEN WASHED OR UNWASHED AND DILUTED IN SKIM MILK-GLUCOSE AND TRIS-EGG YOLK EXTENDERS

The objective of this experiment was to compare *in vitro* four treatments to cool goat semen. Were collected 32 ejaculates of four goats, which were submitted to the extenders skim milk-glucose and tris-egg yolk, and processed with or without centrifugation. Afterwards, the semen was cooled and stored at 4° C during 48 hours. The results were expressed by averages and standard deviation and submitted to ANOVA ($p < 0.05$) to statistical analysis (SPSS - version 11.0). The averages obtained for the samples

of milk-glucose without (T1) and with (T2) centrifugation and tris-egg yolk without (T3) and with (T4) centrifugation, after 48 hours of cooling, were respectively, 33.00; 30.68; 40.62 and 46.78 for motility (%) and 2.23; 2.34; 2.65 and 3.25 for vigor (0-5). For the acrosome pathology (%) and tail pathology (%), after 48 hours stored at 4° C, the averages were 5.16; 5.94; 3.81; 4.47 and 16.25; 12.38; 15.34; 11.47, respectively for the samples T1, T2, T3 e T4. The treatments did not modify the pH ($p > 0.05$). The extender tris-egg yolk

was more efficient in preserving ($p < 0.05$) the motility, vigor and acrosome pathology, than the extender milk-glucose. Nevertheless the removal of the seminal plasma did not

influence ($p > 0.05$) on the seminal characteristics, except to tail pathology.

KEY WORDS: Centrifugation, cooling, extenders, goat, semen.

INTRODUÇÃO

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas, visando avaliar a viabilidade do sêmen caprino, diluído, criopreservado ou não, para determinação da substância que proporciona melhores condições para sobrevivência espermática e conseqüentemente melhores índices de fertilidade. Vale destacar que um dos pré-requisitos para o sucesso da inseminação artificial (IA) é o uso de um diluente capaz de manter a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (MORENO et al., 2001).

Por razões econômicas e práticas, busca-se desenvolver um método mais eficiente para a conservação do sêmen no estado líquido, resfriado, para superação das dificuldades inerentes ao processo de congelamento, tendo em vista que o uso do sêmen resfriado como uma alternativa ao sêmen congelado traria vantagens em sistemas de produção extensivos (LEBOEUF et al., 2000). O processo de resfriamento, no entanto, pode causar danos irreversíveis ao espermatozoide, em virtude do choque térmico, que pode ser minimizado pelo resfriamento lento do sêmen diluído, em uma proporção de $0,05^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até 4°C (PICKETT & AMANN, 1993) e pela adição de fosfolipídeos do leite ou da gema de ovo nos diluidores de sêmen (AMANN & PICKETT, 1987; DEN DAAS, 1992; WATSON, 1995).

Assinale-se, porém, que o plasma seminal de caprinos é rico em fosfolipase A. Este, ao interagir com os fosfolipídeos dos diluidores, libera ácidos graxos, os quais são espermicidas (ROY, 1957; AAMDAL et al. 1965; CORTEEL, 1974). Na espécie caprina, a remoção do plasma seminal por centrifugação imediatamente após a colheita aumenta a percentagem de células vivas e sua motilidade durante a armazenagem em diluentes de gema de ovo ou leite (CORTEEL, 1977; TULI & HOLTZ, 1994). RITAR & SALAMON (1982), no entanto, recomendaram o uso de 1,5% de gema de ovo, sem re-

moção do plasma seminal, como uma alternativa prática.

CHAUHAN & ANAND (1990), em estudo da atividade das enzimas fosfolipase e lisofosfolipase sobre as lecitinas contidas na gema de ovo utilizada no diluente à base de tris, concluíram, porém, que não há hidrólise desses fosfolipídeos. Observaram ainda que a congelamento do sêmen em diluente de tris-gema de ovo, sem a remoção do plasma seminal, produz altas taxas de fertilidade. AZERÉDO et al. (2001) concluíram que a remoção do plasma seminal foi prejudicial para a congelamento de sêmen caprino, uma vez que o percentual de espermatozoides com membranas plasmáticas íntegras e de motilidade espermática diminuíram após a centrifugação do plasma seminal.

Diante desses dados, desenvolveu-se um experimento para comparar quatro tratamentos usados no resfriamento de sêmen caprino. Para tanto, submeteu-se o sêmen aos diluidores tris-gema de ovo e leite desnatado-glicose, e processado com ou sem centrifugação do plasma seminal, em que se avaliaram os seguintes parâmetros seminais: motilidade total, vigor, patologia de acrossoma, patologia de cauda e pH. Para isso, determinaram-se o processamento e o diluente mais eficiente em preservar as referidas características seminais, durante o resfriamento e conservação a 4°C por até 48 horas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se quatro reprodutores caprinos com idade variando entre três e cinco anos, sendo dois da raça Alpina e dois Saanen, submetidos previamente a exames clínicos e andrológicos. A alimentação foi feita em sistema de confinamento, com capim de corte, feno e ração balanceada duas vezes ao dia, e água e sal mineral *ad libitum*. Procedeu-se ao processamento do sêmen e à avaliação das características analisadas nos meses de janeiro a junho de 2003.

A colheita de sêmen foi efetuada por meio de vagina artificial, acoplada a um tubo de vidro graduado, aquecida com água a 45° C, sendo necessário utilizar uma cabra com estro induzido, como mane-quim. Colheram-se oito ejaculados de cada reprodutor, em dias alternados durante dezesseis dias, perfazendo um total de 32 amostras.

Após cada colheita, colocou-se o sêmen em banho-maria a 37°C e determinou-se o volume do ejaculado imediatamente, através da graduação do tubo coletor. Analisaram-se a cor e o aspecto pela observação direta (MIES FILHO, 1987) e determinou-se o pH utilizando-se uma fita colorimétrica apropriada (Neutralitã – Laboratório Merk). O turbilhonamento foi avaliado por meio de uma alíquota de 20 ml de sêmen sobre lâmina em placa aquecida, observada em microscópio óptico e classificada com base numa escala de zero (ausência) a cinco (turbilhão máximo). Procedeu-se à determinação da atividade de movimento dos espermatozoides em motilidade total, expressa em percentagem (0% a 100%), por avaliação microscópica de uma alíquota de 10 mL de sêmen entre lâmina e lamínula, aquecidos à temperatura de 37° C. Efetuou-se a classificação do vigor do movimento dos espermatozoides utilizando-se uma escala subjetiva de zero (vigor nulo) a cinco (vigor máximo). As avaliações do turbilhonamento, da motilidade e do vigor foram realizadas em microscópio óptico com aumento de cem vezes, conforme CBRA (1998).

Diluiu-se uma alíquota de 20 mL de sêmen em 4 mL de solução formol-salina tamponada (proporção de 1:200), para posterior determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer, em microscópio óptico com aumento de quatrocentas vezes, sendo o número de espermatozoides expresso em mL, conforme CBRA (1998). Para a avaliação da morfologia espermática do sêmen fresco, utilizaram-se lâminas contendo esfregaços corados, segundo KARRAS (1950), citado por PAPA et al. (1988), por meio de microscopia comum. Em cada lâmina foram avaliadas cem células de diferentes campos e determinada a percentagem de anomalias totais (EVANS & MAXWELL, 1987). No momento zero (M0) e nos demais momentos, avaliou-se

apenas o acrossoma quanto às seguintes patologias: edema, destacado, deformado e oblíquo; e a cauda quanto às patologias: enrolada, dobrada, fraturada e edema de peça intermediária.

Nesse experimento testaram-se dois diluidores: um à base de leite desnatado-glicose, descrito por CORTEEL (1974); e outro à base de tris-gema, descrito por EVANS & MAXWELL (1987). Após a colheita, retiraram-se duas alíquotas de 200mL de sêmen. Uma delas foi dividida em duas partes de 100mL, colocadas em diferentes tubos plásticos de 15 mL e pré-diluídas com 1,0 mL dos meios diluidores em teste, sem a remoção do plasma seminal, constituindo os tratamentos T1 (sem centrifugação diluída em leite desnatado-glicose) e T3 (sem centrifugação diluída em tris-gema). A outra alíquota de 200mL foi colocada em tubo idêntico aos utilizados para T1 e T3, diluída em solução Ringer com Lactato, na proporção de 1:9, e centrifugada a 600 G por dez minutos (DELL' AQUA JUNIOR & PAPA, 2001), sendo, em seguida, retirado o sobrenadante, a fim de ser removido o plasma seminal. O *pellet* ressuspensão em meio de centrifugação foi, então, dividido em duas partes, colocadas em tubos plásticos com tampa e pré-diluídos com 1,0 mL dos meios diluidores em teste, constituindo os tratamentos T2 (com centrifugação diluída em leite desnatado-glicose) e T4 (com centrifugação diluída em tris-gema), totalizando quatro amostras – T1, T3, T2, T4 –, pré-diluídas numa proporção de 1:10.

A concentração e o volume final das amostras foram determinados com base na dose inseminante de 60×10^6 espermatozoides, segundo EVANS & MAXWELL (1987), CORTEEL & LEBOEUF (1990). Cada amostra de ejaculado (T1, T3, T2, T4) possuía o equivalente a quatro doses de 0,5 mL, obtendo-se uma concentração final de 240×10^6 espermatozoides por amostra em um volume final de 2 mL.

As amostras T1, T3, T2 e T4, armazenadas em tubos plásticos fechados e identificados, foram colocadas dentro de um *becker* contendo 500 mL de água e levadas a um refrigerador, o qual submeteu o sêmen a uma curva lenta de resfriamento (0,1°C/min) até uma temperatura constante de 4°C. Para a determinação da taxa de resfriamento das amostras

e a manutenção da temperatura a 4°C, utilizou-se um sensor de imersão acoplado a um termômetro eletrônico digital de leitura instantânea. Nos momentos M0 (0h), M1 (3h), M2 (6h), M3 (12h), M4 (24h), M5 (48h), após o início do resfriamento, retiraram-se alíquotas das quatro amostras de sêmen, aquecidas a 37°C, e procedeu-se à sua avaliação, quanto à motilidade total, vigor, patologia de acrossoma e patologia de cauda. A avaliação do pH foi feito apenas em M0, M4 e M5, da mesma forma que se procedeu com o sêmen fresco.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. Consideram-se os ejaculados repetições (N=32), e os protocolos de processamento do sêmen (leite desnatado-glicose sem centrifugação, leite desnatado-glicose com centrifugação, tris-gema sem centrifugação, e tris-gema com centrifugação), tratamentos (4). Efetuou-se a análise estatística no *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS versão 11.0). Os resultados das características seminais avaliadas (motilidade total, vigor, patologia de acrossoma, patologia de cauda e pH), nos diferentes tratamentos e momentos de resfriamento, foram expressos em média e desvio padrão e submetidos ao teste de ANOVA (análise de variância entre grupos). Em todos os testes, utilizou-se o nível de significância de 0,05, comparando-se as médias pelo Teste de Tukey (HSD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ejaculados apresentaram-se dentro dos padrões normais para a espécie caprina, considerando-se satisfatórios para serem submetidos ao processo de resfriamento. Os valores mínimos de motilidade total, vigor, turbilhonamento e o valor máximo de patologia espermática total foram estipulados em 70%, 3, 3 e 20%, respectivamente.

A curva de resfriamento, após atingir 4°C, se manteve constante durante todo o tempo em que o sêmen foi armazenado. Neste experimento, utilizou-se uma curva de resfriamento lenta, na qual a temperatura decresceu em média 0,08°C/ minutos, a fim de minimizar os efeitos do choque térmico sobre as células espermáticas. Essa velocidade está de acordo com a reportada por PICKETT & AMANN (1993), que

sugeriram uma curva de 0,05°C/ minutos de 20°C até 4°C para o sêmen eqüino. Já SAHNI (1987) sugeriu, para o sêmen caprino, uma curva de refrigeração compreendida entre 0,25°C e 0,35°C/ minutos, até que seja atingida a temperatura de 5°C.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos quanto à motilidade total dos espermatozoides de acordo com o tratamento utilizado. Verificou-se que a centrifugação, independente do diluidor utilizado, reduziu significativamente a motilidade total, no início do resfriamento (M0). Após doze horas de resfriamento, no M3, as amostras diluídas em tris-gema apresentaram médias de motilidade (%) de 69,75 e 65,31 para T3 e T4, respectivamente, superiores ($p < 0,05$) àquelas das amostras diluídas em leite desnatado-glicose (46,78 e 45,78 para T1 e T2), independente da centrifugação. Já nos momentos M4 e M5, a motilidade total no T4 apresentou-se semelhante ($p > 0,05$) ao T3 e maior ($p < 0,05$) do que as apresentadas por T1 e T2, que por sua vez também foram semelhantes ao T3. A maior média de motilidade total após 24 horas de resfriamento foi 60,65% no meio tris-gema centrifugado. Esse resultado é similar ao encontrado por AZEVÊDO & TONIOLLI (2000), com a motilidade espermática no diluidor leite desnatado, adicionado de ácido 3-indol-acético (IAA), após 24 horas de resfriamento a 4°C, de 61,5%. Após 48 horas de estocagem, o melhor resultado de motilidade obtido neste estudo foi 46,78%, também no meio tris-gema centrifugado, corroborando com os resultados de AZEVÊDO & TONIOLLI (2000) e FIGUEIRÊDO et al. (2002).

Os resultados deste experimento, no entanto, foram inferiores aos encontrados por ROCA et al. (1997), que, em avaliação das médias de motilidade no sêmen resfriado a 5°C em diluidor à base de tris-gema, centrifugado e não centrifugado, obtiveram valores de motilidade (escala 0-5) de 3,5 e 3,25 respectivamente, após 96 horas de conservação. Do M4 para M5, houve uma redução da motilidade total em todos os tratamentos, em virtude de danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais causados aos espermatozoides, resultando em uma redução da viabilidade e fertilidade, como descrito por ROY (1957) e IRITANI & NISHIKAWA (1961).

Observou-se que houve uma redução do vigor espermático (Tabela 2) após a centrifugação do sêmen diluído no tris-gema, no M0. Assim como a motilidade total, durante M1, M2 e M3, as amostras diluídas no tris-gema demonstraram médias de vigor superiores ($p < 0,05$) àquelas diluídas no leite desnatado-glicose, independente do processo de centrifugação. Entretanto, nos momentos M4 e M5, os resultados de vigor nas amostras diluídas em tris-gema centrifugadas (T4) foram semelhantes ($p > 0,05$) aos daquelas diluídas em tris-gema sem centrifugação (T3) e maior ($p < 0,05$) do que os apresentados pelas amostras diluídas em leite desnatado-glicose com e sem centrifugação (T1 e T2), que, contudo, foram iguais ao T3. Constatou-se neste estudo que o vigor apresentou o mesmo comportamento da motilidade com o resfriamento a 4°C e possivelmente uma correlação positiva. MORENO et al. (2001), nesse sentido, afirmam que a motilidade e o vigor espermático não devem ser os únicos critérios de avaliação após a diluição do sêmen caprino.

De acordo com os resultados obtidos quanto à patologia de acrossoma dos espermatozoides (Tabela 3), verifica-se que o percentual de patologias de acrossoma aumentou logo após a centrifugação (M0) nos dois diluidores utilizados. Nos momentos M2 e M3, o sêmen diluído em tris-gema sem centrifugação (T3) apresentou menos patologia de acrossoma ($p < 0,05$) que o sêmen diluído em leite desnatado-glicose centrifugado ou não, e foi igual ao sêmen diluído em tris-gema centrifugado (T4). No último momento avaliado (M5), o sêmen diluído em leite desnatado-glicose centrifugado apresentou a maior média, 5,94 % de patologia de acrossoma, enquanto que não houve diferenças entre T1, T3 e T4, cujas médias foram 5,16%; 3,81% e 4,47%, respectivamente. As amostras centrifugadas não demonstraram diferenças ($p > 0,05$) em relação às não centrifugadas, independente do diluente utilizado neste experimento. Os resultados de patologia de acrossoma obtidos neste estudo são similares aos de DEKA & RAO (1985), que encontraram valores de patologia de acrossoma de 4,42% e 4,48% no sêmen diluído em meios à base de tris-gema glicerol e leite desnatado gema glicerol, respectivamente, após resfriamento a 5° C. Contudo, AZEVÊDO &

TONIOLLI (2000) encontraram valores superiores aos obtidos neste estudo ao resfriar sêmen caprino em leite desnatado, de 6,90% e 10,50%, após 24 e 48 horas de resfriamento, respectivamente.

Na Tabela 4, com resultados obtidos quanto à patologia de cauda dos espermatozoides, verifica-se que, após a centrifugação (M0), as amostras diluídas em leite-glicose apresentaram aumento da percentagem que em M1 se manteve inalterada em todos os tratamentos. Em M3, a amostra leite desnatado centrifugada apresentou maior média ($p < 0,05$) de patologia de cauda (11,59%), enquanto que, no M4, a amostra leite-desnatado sem centrifugação demonstrou patologia de cauda superior (14,91%) às demais amostras. NUNES & FELICIANO SILVA (1984), em avaliação do sêmen caprino diluído em leite desnatado glicose e resfriado a 4°C, encontraram porcentagem de patologia de cauda de 8,6%, 11% e 13,6%, respectivamente, após 0, 12 e 24 horas de resfriamento, valores esses similares aos obtidos no presente estudo. Trata-se de resultados que confirmam o efeito do resfriamento, causando choque térmico nas células espermáticas, como foi reportado por GRAHAM (1996).

Os resultados do pH do sêmen, de acordo com os tratamentos utilizados, são demonstrados na Tabela 5, em que se observa que o pH diferiu ($p < 0,05$) apenas para T2, em M4 e M5. Em relação à comparação entre T1, T2, T3 e T4, não se observaram diferenças ($p > 0,05$) em todos os momentos avaliados. Esses resultados demonstram que ambos os diluidores foram capazes de manter o sistema tampão que mantém o pH seminal próximo a 7,0, mesmo nas amostras em que o plasma não tenha sido removido. Segundo EVANS & MAXWELL (1987) e MIES FILHO (1987), a capacidade em manter o pH é uma das características de um bom diluidor.

Demonstraram-se os melhores resultados de motilidade total, vigor e patologias de acrossoma quando o sêmen foi diluído no meio tris-gema, em comparação ao meio leite desnatado-glicose, o que demonstra uma boa proteção da gema de ovo. Isso está de acordo com o observado por CHAUHAN & ANAND (1990), que obtiveram melhores resultados de motilidade, quantidade de espermatozoides vivos e defeito de acrossoma durante e após o pro-

cesso de congelamento no meio tris-gema.

As amostras de sêmen resfriadas apresentaram maior ($p < 0,05$) porcentagem de patologias de acrossoma e patologia de cauda, independente do diluidor utilizado, quando comparadas com as amostras de sêmen antes do resfriamento, resultados esses que estão de acordo com os encontrados por RIBEIRO FILHO (1996), em resfriamento de sêmen equino.

Observou-se que após a centrifugação houve uma brusca redução da motilidade e do vigor, e um aumento das patologias de acrossoma dos espermatozoides nos dois diluidores utilizados, o que não ocorreu com as amostras que não foram centrifugadas. Esses resultados corroboram com

CORTEEL (1981) e GIL et al. (2002), em relato de que o processo de centrifugação pode causar estresse físico aos espermatozoides. Entretanto, após o início do resfriamento, durante as 48 horas de conservação, não se encontraram diferenças significativas entre as amostras, com e sem plasma seminal, o que está de acordo com os resultados observados por ROCA et al. (1997), em avaliação das médias de motilidade e de acrossomas normais no sêmen resfriado a 5°C em diluidor à base de tris-gema, centrifugado e não centrifugado. Tais resultados são discordantes dos obtidos por CORTEEL (1974) e MEMON et al. (1985), que observaram efeito benéfico da retirada do plasma sobre a motilidade dos espermatozoides.

TABELA 1. Média (x) e desvio padrão (s) da motilidade total (%) dos espermatozoides diluídos no meio leite desnatado-glicose sem (T1) e com (T2) centrifugação e do sêmen no meio tris-gema sem (T3) e com (T4) centrifugação, 0h (M0), 3h (M1), 6h (M2), 12h (M3), 24h (M4) e 48h (M5) após o início do resfriamento.

Tratamento	M0 x ± s	M1 x ± s	M2 x ± s	M3 x ± s	M4 x ± s	M5 x ± s
T1	83,59 ± 9,69 Aa	56,41 ± 27,36 Ab	50,72 ± 31,51 Ab	48,37 ± 33,23 Ab	42,43 ± 34,55 Abc	33,00 ± 31,04 Ac
T2	70,62 ± 15,24 Ba	54,88 ± 20,49 Ab	52,50 ± 19,55 Abc	45,78 ± 20,91 Abc	44,93 ± 22,07 Ac	30,68 ± 18,20 Ad
T3	84,06 ± 8,46 Aa	80,63 ± 11,55 Ba	77,66 ± 13,96 Bab	69,75 ± 23,63 Bb	56,28 ± 29,62 ABc	40,62 ± 29,61 ABd
T4	70,00 ± 17,08 Ba	71,09 ± 17,49 Ba	72,34 ± 19,04 Ba	65,31 ± 18,31 Bab	60,65 ± 25,47 Bbc	46,78 ± 24,75 Bd

Médias dentro de colunas seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Médias dentro de linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

TABELA 2. Média (x) e desvio padrão (s) do vigor (0-5) dos espermatozoides diluídos no meio leite desnatado-glicose sem (T1) e com (T2) centrifugação e do sêmen no meio tris-gema sem (T3) e com (T4) centrifugação, 0h (M0), 3h (M1), 6h (M2), 12h (M3), 24h (M4) e 48h (M5) após o início do resfriamento.

Tratamento	M0 x ± s	M1 x ± s	M2 x ± s	M3 x ± s	M4 x ± s	M5 x ± s
T1	4,45 ± 0,26 ABa	3,28 ± 1,22 Ab	3,00 ± 1,36 Abc	2,97 ± 1,39 Abc	2,50 ± 1,63 Acd	2,23 ± 1,53 Ad
T2	4,23 ± 0,33 Aa	3,37 ± 0,79 Abc	3,42 ± 0,74 Ab	3,00 ± 0,95 Abc	2,95 ± 0,91 ABc	2,34 ± 1,17 Ad
T3	4,69 ± 0,27 Ba	4,34 ± 0,36 Bab	4,27 ± 0,56 Bab	4,09 ± 0,90 Bb	3,50 ± 1,32 BCc	2,65 ± 1,67 ABd
T4	4,28 ± 0,60 Aa	4,31 ± 0,65 Ba	4,16 ± 0,68 Bab	4,03 ± 0,89 Bab	3,84 ± 1,00 Cb	3,25 ± 1,29 Bc

Médias dentro de colunas seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Médias dentro de linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

TABELA 3. Média (x) e desvio padrão (s) das patologias do acrossoma (%) dos espermatozoides diluídos no meio leite desnatado-glicose sem (T1) e com (T2) centrifugação e do sêmen no meio tris-gema sem (T3) e com (T4) centrifugação, 0h (M0), 3h (M1), 6h (M2), 12h (M3), 24h (M4) e 48h (M5) após o início do resfriamento.

Tratamento	M0 x ± s	M1 x ± s	M2 x ± s	M3 x ± s	M4 x ± s	M5 x ± s
T1	2,41 ± 1,01 Aa	3,78 ± 1,52 ABb	4,63 ± 1,68 ABbc	4,94 ± 2,48 ABc	4,50 ± 2,14 ABbc	5,16 ± 2,24 ABc
T2	3,16 ± 1,22 Ba	4,41 ± 1,72 Ab	5,16 ± 1,55 Bbc	5,81 ± 2,26 Bc	5,38 ± 1,96 Ac	5,94 ± 2,00 Bc
T3	1,78 ± 0,87 Ca	3,28 ± 1,30 Bb	3,56 ± 1,37 Cbc	3,37 ± 1,86 Cb	4,25 ± 2,09 Bc	3,81 ± 1,84 Abc
T4	2,84 ± 1,08 ABa	3,81 ± 1,20 ABb	4,31 ± 1,49 ACbc	4,03 ± 1,66 ACbc	5,06 ± 1,72 ABc	4,47 ± 1,81 Abc

Médias dentro de colunas seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente (p<0,05).

Médias dentro de linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente (p<0,05).

TABELA 4. Média (x) e desvio padrão (s) das patologias de cauda (%) dos espermatozoides diluídos no meio leite desnatado-glicose sem (T1) e com (T2) centrifugação e do sêmen no meio tris-gema sem (T3) e com (T4) centrifugação, 0h (M0), 3h (M1), 6h (M2), 12h (M3), 24h (M4) e 48h (M5) após o início do resfriamento.

Tratamento	M0 x ± s	M1 x ± s	M2 x ± s	M3 x ± s	M4 x ± s	M5 x ± s
T1	6,69± 3,16 Aa	6,84± 2,24 Aa	6,19± 2,56 ABa	7,91± 4,41 Aa	14,19± 5,17 Ab	16,25± 6,55 Ab
T2	8,13± 3,41 Ba	7,72± 2,63 Aa	7,91± 3,54 ACa	11,59± 5,89 Bc	10,31± 4,97 Bbc	12,38± 6,50 Bc
T3	5,94± 2,40 Aa	6,59± 3,29 Aa	8,22± 5,14 Aa	7,34± 3,40 Aa	12,13± 6,77 BCb	15,34± 5,12 Ac
T4	7,03± 3,20 ABa	7,16± 3,99 Aa	7,22± 2,07 Aa	7,59± 4,32 Aa	9,13± 4,94 BDab	11,47± 7,15 Bb

Médias dentro de colunas seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente (p<0,05).

Médias dentro de linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente (p<0,05).

TABELA 5. Média (x) e desvio padrão (s) do pH (0-14) do sêmen diluído no meio leite desnatado-glicose sem (T1) e com (T2) centrifugação, e do sêmen no meio tris-gema sem (T3) e com (T4) centrifugação, 0h (M0), 24h (M4) e 48h (M5) após o início do resfriamento.

Tratamento	M0 x ± s	M4 x ± s	M5 x ± s
T1	6,51 ± 0,08 Aa	6,48 ± 0,08 Aa	6,46 ± 0,12 Aa
T2	6,54 ± 0,14 Aa	6,5 ± 0,00 Ab	6,5 ± 0,00 Ab
T3	6,48 ± 0,20 Aa	6,46 ± 0,17 Aa	6,46 ± 0,17 Aa
T4	6,53 ± 0,25 Aa	6,46 ± 0,17 Aa	6,45 ± 0,19 Aa

Médias dentro de colunas seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente (p<0,05).

Médias dentro de linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente (p<0,05).

CONCLUSÕES

O diluidor tris-gema mostrou-se melhor que o leite desnatado-glicose, em relação à motilidade total, vigor e patologias de acrossoma espermáticos de três até doze horas de resfriamento. Contudo, não houve diferença entre os diluidores quanto à patologia de cauda.

A remoção do plasma seminal, nos diluidores à base de tris-gema e à base de leite desnatado-glicose, não alterou a motilidade, o vigor, as patologias de acrossoma e o pH espermático. Entretanto, em relação à patologia de cauda a centrifugação foi benéfica após 24 horas de resfriamento no tris-gema, e a partir de seis horas no leite desnatado-glicose.

O sêmen diluído em tris-gema submetido à centrifugação, de 24 até 48 horas, resultou em maior motilidade total e vigor em relação ao sêmen diluído em leite desnatado, centrifugado e não centrifugado.

O resfriamento do sêmen caprino a 4° C, em todos os tratamentos estudado mostrou viabilidade até 48 horas de conservação. Entretanto, até 24 horas, o sêmen apresentou porcentagem de motilidade, de vigor, de patologias de acrossoma e de patologias de cauda capazes de garantir uma maior fertilidade dentro de um período suficiente para transportá-lo a longas distâncias.

REFERÊNCIAS

- AAMDAL, J.; LYGSET, O.; FOSSUM, K. Toxic effect of lysolecithin on sperm a preliminary report. **Nordisk Veterinariaer Medicin**, v. 17, p. 633-634, 1965.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.
- AZEVÊDO, D.M.M.R.; TONIOLLI, R. Avaliação *in vitro* do sêmen de caprinos do tipo racial Marota diluído em água de coco estabilizada com antibióticos e leite desnatado adicionado de ácido 3-indol-acético (IAA). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 3, p. 187-193, 2000.
- AZERÊDO, G.A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-tawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.
- CHAUHAN, M.S.; ANAND, S.R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. **Theriogenology**, v. 34, n. 5, p. 1003-1013, 1990.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. HENRY, M; NEVES, JP (ed), Belo Horizonte, 1998. 49p.
- CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoides de boue conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal effect du glucose. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 14, n. 1B, p. 741-745, 1974.
- CORTEEL, J.M. Production, storage and artificial insemination of goat semen. **Management of reproduction in sheep and goats symposium**, Madison, v. 24, n. 25, p. 188-274, 1977.
- CORTEEL, J.M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: GALL, C. **Goat production**. London: Academic Press, p. 171-191, 1981.
- CORTEEL, J.M.; LEBOEUF, B. Evaluation tchnico-économique de l'insémination artificielle caprine. **Revue D'Élevage Insemination**, v. 237, p. 3-17, 1990.
- DELL'AQUA JÚNIOR, J.A.; PAPA F.O. Efeito de diluente e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 460-462, 2001.
- DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen Buck semen. **Indian Veteterinary Journal**, v. 62, p. 414-417, 1985.
- DEN DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n.1, p. 87-94, 1992.

- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's. **Artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth Publishers, Sydney, 1987.
- FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES J.F.; CAMPOS C.A.N.; MONTEIRO, A.W.U.; SILVA FILHO A.H.S. Viabilidade do sêmen caprino Saanen diluído em água de coco e resfriado a 4°C. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 5, p. 31-38, 2002.
- GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ MARTINEZ H. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of sêmen after cervical insemination. **Theriogenology**, v. 57, p. 1781-1792, 2002.
- GRAHAM, J. K. Analysis of stallion semen its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 119-129, 1996.
- IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg-yolk coagulating factors in goat semen: II Properties of the coagulating factors and influential conditions for coagulation. In: SILVER JUBILEE LABORATORY ANIMALS, Husbandry: Kyoto University, **PROCEEDINGS**, p. 97-104, 1961.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.
- MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K.N.; OTT, R.S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 2, p. 473-475, 1985.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 6 ed. Porto Alegre: Editora Sulina, v. 2, p. 475, 1987.
- MORENO, F.A.B.; BISPO, C.A.S.; GUERRA, M.M.P.; TENÓRIO FILHO, F.; OLIVEIRA, R.R.; ALVES, L.C.; WISCHARAL, A. Motilidade, vigor e dosagem de Aspartato Amino Transferase no sêmen caprino diluído em leite desnatado e Fiser. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 460-462, 2001.
- NUNES, J.F.; FELICIANO SILVA, A.E.D. Tecnologia do sêmen resfriado em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 8, n. 2, p. 121-127, 1984.
- PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, I.M.; BICUDO, S.D.; RAMIRES, P.R.N.; LOPES, M.D. Coloração espermática segundo KARRAS modificada pelo emprego do Barbatimão (*Stryphodendrum barbatiman*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 115-23, 1988.
- PICKETT, B.W.; AMMAN R.P. Cryopreservation of semen. In: MICKINNON AO, VOSS JL (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 769-789, 1993.
- RIBEIRO FILHO, A. de L. **Influência de um sistema de refrigeração e conservação sobre parâmetros espermáticos do sêmen eqüino**. 1996. Tese (Doutorado) UFMG, Belo Horizonte, 1996.
- RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and 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 Biological Sciences**, v. 35, p. 305-312, 1982.
- ROCA, J.; CORRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa dilute in Tris egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Ruminant Research**, v. 25, p. 147-153, 1997.
- ROY, A. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, London, p. 179-318, 1957.
- SAHNI, K.L. Practical aspect of artificial insemination of goats in India. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987. Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa-DTC, p.549-569, 1987.

STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES (SPSS) 11.0 for Windows. Chicago: SPSS Inc.; 2001.

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

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, n. 4, p. 871-889, 1995.

Protocolado em: 22 nov. 2004. Aprovado em: 5 maio 2005.