

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

JEFFERSON HALLISSON LUSTOSA DA SILVA

EFEITO DA ÉPOCA DO ANO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE CAPRINOS AZUL, CANINDÉ E MOXOTÓ NAS ESTAÇÕES
SECA E CHUVOSA

Teresina - PI
2017

JEFFERSON HALLISSON LUSTOSA DA SILVA

EFEITO DA ÉPOCA DO ANO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE CAPRINOS AZUL, CANINDÉ E MOXOTÓ NAS ESTAÇÕES
SECA E CHUVOSA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S586c Silva,Jefferson Hallisson Lustosa da
Efeito da época do ano sobre as características do sêmen crio-
preservado de caprinos azul,canidé e moxotó nas estações seca e
chuvosa / Jefferson Hallisson Lustosa da Silva - 2017.
55 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí,Teresina, 2017.

Orientação: Prof.Dr. José Adalmir Torres de Souza

1.Caprino - Sêmen 2. Criopreservação 3. Banco de
germoplasma I. Título

CDD 636.390824

ERRATA

SILVA, J. H. L. **Efeito da época do ano sobre as características do sêmen criopreservado de caprinos Azul, Canindé e Moxotó nas estações seca e chuvosa.** 2017. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

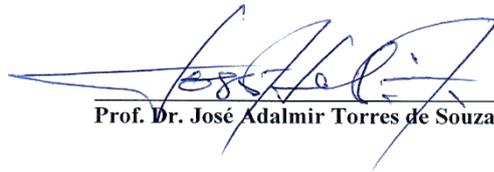
| Página | Onde se lê |
|--------------------|--|
| Folha de aprovação | Caracterização física e morfológica do sêmen de caprinos Azul, Canindé e Moxotó nas estações seca e chuvosa |
| Página | Leia-se |
| Folha de aprovação | Efeito da época do ano sobre as características do sêmen criopreservado de caprinos Azul, Canindé e Moxotó nas estações seca e chuvosa |

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MORFOLÓGICA DO SÊMEN DE CAPRINOS
AZUL, CANINDÉ E MOXOTÓ NAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA**

JEFFERSON HALLISSON LUSTOSA DA SILVA

Dissertação aprovada em: 16/02/2017

Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Ângela Maria Xavier Eloy (Externa) / EMBRAPA

ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY
PESQUISADORA EMBRAPA CAPRINOS
EMPENHO 0645



Prof. Dr. Antonio de Sousa Junior (Interno) / CTT/UFPI

Dedico,

*Aos meus pais (José e Celeste) e aos irmãos (Bruno e
Jéssica), que são a base para seguir em frente
sempre forte, obrigado pela confiança e por essa
conquista, que compartilho com vocês*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me guiar em toda minha caminhada e conquistas.

À minha família por todo apoio indispensável estando ao meu lado em todos os instantes.

À Universidade Federal do Piauí e Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por prestar todo o apoio necessário durante a formação acadêmica.

Ao meu orientador Professor Dr. José Adalmir Torres de Souza pela orientação, e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao Professor Dr. Antônio de Sousa Júnior pela inestimável colaboração durante toda a execução do trabalho e pela amizade.

À Professora Dra. Isôlda Márcia por toda a amizade, cumplicidade e pelos conselhos.

À funcionária “dona Noêmia” por toda presteza e zelo com todos.

Aos amigos Cícero Soares, Viviany Rodrigues e Micherlene Lustosa pela grande amizade e pelas conversas sempre agradáveis.

A toda equipe do LBRA/UFPI pela receptividade e cordialidade pelo qual fui recebido durante a realização do mestrado e pela convivência harmoniosa. Em especial ao colega Felipe Pereira da Silva Barçante, por todos os ensinamentos, amizade e por estar sempre disponível em ajudar.

Aos amigos Marcos Celestino, Bruno Prado, Sávio Ruan, Filipe Nunes, Dayana Maria, Dayse Andrade e Yndyra Nayan pela ajuda na conclusão desse trabalho.

Ao senhor José Ferreira Dantas Filho pela grandiosa gentileza em ceder as instalações e animais da Fazenda Faveira, durante a realização desse trabalho.

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa.

À equipe do Laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará, em especial à Doutoranda Talita Câmara, pela presteza em colaborar conosco;

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização dessa conquista.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | vii |
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT | x |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 Anatomofisiologia da reprodução em caprinos | 13 |
| 2.2 Considerações entre época do ano e qualidade seminal..... | 14 |
| 2.3 Coleta e avaliação da qualidade seminal | 15 |
| 2.3.1 Avaliação clássica do sêmen caprino | 16 |
| 2.3.2 Testes complementares de avaliação da integridade espermática | 17 |
| 2.3.2.1 Análise estrutural e funcional de espermatozoides | 17 |
| 2.3.3 Análise computadorizada do sêmen..... | 19 |
| 2.4 Criopreservação seminal..... | 20 |
| 2.5 Conservação de recursos genéticos locais..... | 22 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |
| CAPITULO I..... | 31 |
| RESUMO..... | 32 |
| ABSTRACT | 33 |
| INTRODUÇÃO..... | 34 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 35 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 40 |
| CONCLUSÕES | 51 |
| AGRADECIMENTOS | 51 |
| REFERÊNCIAS | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- μL – Microlitro
- μm - Micrômetro
- ALH – Amplitude Lateral da Cabeça
- AZ – Azul
- BCF – Batimento flagelar cruzado
- CASA - *Computer-Assisted Sperm Analysis*
- CD - Canindé
- DCF – Diacetato de carboxifluoresceína
- EC – Época chuvosa
- ES – Época seca
- g - grama
- HOST - Hypoosmotic Swelling Test (Teste Hiposmótico)
- Hz - Hertz
- IP – Iodeto de propídio
- ITGU – Índice de Temperatura de Globo e Umidade
- JC-1 – Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina
- LIN – Linearidade
- mg - Miligrama
- mL – Mililitro
- mm - Milímetro
- mOsm/L – Miliosmol/litro
- MOX - Moxotó
- MNP – Motilidade não Progressiva
- MP – Motilidade Progressiva
- °C – Graus Celsius
- Sptz – Espermatozóide
- STR - Retilinearidade
- TTR – Teste de Termorresistência
- VAP – Velocidade de trajeto
- VCL – Velocidade curvilinear
- VSL – Velocidade progressiva
- % - Porcentagem

LISTA DE TABELAS**Capítulo 1**

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabela 1 Médias e desvios-padrão das dimensões testiculares de reprodutores caprinos Azul, Canindé e Moxotó, Elesbão Veloso-PI, 2016 | 40 |
| Tabela 2 Médias e desvios-padrão dos parâmetros físicos (volume, turbilhão, motilidade, vigor) e concentração espermática do sêmen de caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso - PI, 2016 | 42 |
| Tabela 3 Médias e desvios-padrão dos parâmetros morfológicos (defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeitos de cauda, defeitos maiores e defeitos totais) de espermatozoides caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso-PI, 2016 | 44 |
| Tabela 4 Motilidade total e vigor de espermatozoides caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX), em diferentes tempos pós-descongelção (0, 60, 120 e 180 minutos), pelo teste de termorresistência (TTR), nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso – PI, 2016 | 45 |
| Tabela 5 Médias e desvios-padrão das características estruturais da célula espermática do sêmen congelado de caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso – PI, 2016 | 47 |
| Tabela 6 Valores médios (%) e desvio padrão de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST), nas raças Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX), nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso-PI, 2016 | 49 |
| Tabela 7 Cinética pós-descongelção (Média±DP) de espermatozoides caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), analisados pelo CASA, Elesbão Veloso-PI, 2016 | 50 |

RESUMO

O espermograma assume grande importância na avaliação da aptidão reprodutiva de um macho destinado à reprodução, pois permite a predição da qualidade do reprodutor, visto que ele demonstra sua *potentia generandi*. A criopreservação de sêmen é uma importante biotécnica reprodutiva, tendo em vista que promove a conservação de germoplasma por tempo indeterminado. Através da criopreservação de sêmen será possível resgatar populações que, por algum motivo, possam ter se extinguido e que tenham importantes características para a pecuária nacional. Dessa forma, o presente trabalho visa analisar o efeito da época do ano sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de caprinos localmente adaptados visando à conservação do material genético dessas raças. Foram utilizados 18 reprodutores caprinos adultos, com idade entre 2 e 5 anos, das raças Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX). Todos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica e andrológica preliminar. As coletas de sêmen foram realizadas no turno da manhã, pelo método da vagina artificial, com auxílio de fêmea estrogenizada. Após a coleta, um *pool* dos ejaculados foram formados para análise, onde uma alíquota de cada amostra foi avaliada quanto aos parâmetros seminais físicos. Outra alíquota foi diluída em solução de formol salino para mensuração da concentração espermática e análise morfológica posterior. O sêmen foi diluído em meio Tris-Gema de acordo com a concentração espermática e congelado em máquina TK 3000 em curva específica para a espécie, e posteriormente armazenado em botijão criogênico a -196°C . Após a descongelação em banho maria a 37°C por 30 segundos, foi avaliado a longevidade espermática através do teste de termorresistência (TTR), mensurando a motilidade e vigor espermáticos em 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelação. O sêmen descongelado foi submetido ao teste de funcionalidade da membrana plasmática pelo HOST. Para análise estrutural dos espermatozoides foram utilizadas sondas fluorescentes, determinando a integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal e atividade mitocondrial das células espermáticas. A cinética espermática pós-descongelação foi mensurada pelo sistema computadorizado de análise seminal (CASA). A análise morfológica dos defeitos espermáticos foi feita pela contagem de 200 células em preparação úmida, quantificando-se os defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeitos de cauda, defeitos maiores e defeitos totais. O volume de sêmen das raças AZ e MX (0,52mL; 0,69mL) foram superiores à da raça CD (0,40mL), no entanto as raças CD e MX apresentaram vigor espermático (2,95; 3,04) superior à raça AZ (2,5). Na época chuvosa (EC) ocorreu menor percentagem de defeitos de cabeça (0,5%), também na EC ocorreu maior proporção de defeitos totais (10,2%). No TTR, ocorreu maior percentagem de motilidade e maior vigor na EC. O grupo AZ apresentou menor motilidade e vigor espermático. Na análise estrutural observou-se maior atividade mitocondrial espermática durante a época seca (ES), sendo as raças CD e MX com maior proporção de células com atividade mitocondrial. Ocorreu maior integridade acrossomal durante a ES e maior funcionalidade de membrana durante a EC. Pela análise computadorizada houve maior percentagem de espermatozoides com motilidade não progressiva (MNP) durante a EC e maior frequência de batimentos de cauda (BCF).

Palavras-chave: sêmen, criopreservação, banco de germoplasma

ABSTRACT

The spermogram is of great importance in the evaluation of the reproductive capacity of a male intended for breeding, because it allows the prediction of the reproducer quality, since it demonstrates its *potentia generandi*. Semen cryopreservation is an important reproductive biotechnology because it promotes conservation of germplasm for an indefinite time. Through the semen cryopreservation it will be possible to rescue populations that, for some reason, may have become extinct and which have important characteristics for national livestock. In this way, the present work aims at analyzing the effect of the time of year on the physical and morphological semen characteristics from locally adapted goats aiming at the conservation of these breeds genetic material. Were used eighteen adult goat breeds, aged 2 to 5 years, of the races, Azul (AZ), Canindé (CD) and Moxotó (MX). All animals were submitted to a preliminary clinical and andrological evaluation. The semen collections were performed in the morning shift, using the artificial vagina method, with the aid of estrogenized female. After a collection, a pool of ejaculates were formed for analysis, where an aliquot of each sample was evaluated for the physical seminal parameters. Another aliquot was diluted in saline formaldehyde solution to measure the sperm concentration and subsequent morphological analysis. The semen was diluted in Tris-Egg Yolk medium according to sperm concentration and frozen in TK 3000 machine in a specific curve for the species, and later stored in a cryogenic canister at -196°C. After thawing in a 37 ° C water bath for 30 seconds, the sperm longevity was evaluated through the thermoresistance test (TTR), measuring sperm motility and vigor at 0, 60, 120 and 180 minutes after thawing, the thawed semen was subjected to the plasma membrane functionality test by HOST. Fluorescent probes were used for structural analysis of spermatozoa determining the integrity of plasma membrane, acrosomal integrity and mitochondrial activity of sperm cells, the post-thaw sperm cells kinetics were measured by computerized system for semen analysis (CASA). The morphological analysis of the spermatid defects was made by counting 200 cells in wet preparation, quantifying head defects, intermediate part defects, tail defects, major defects and total defects. The semen volume of the breeds AZ and MX (0.52mL, 0.69mL) were higher than the CD (0.40mL), however the CD and MX breeds had spermatid vigor (2.95, 3.04) higher than the AZ (2,5). In the rainy season (RS) there was a lower percentage of head defects (0.5%), also in the RS there was a higher proportion of total defects (10.2%). In TTR, there was a higher percentage of motility and higher vigor in the RS. The AZ group presented lower motility and spermatid vigor. In structural analysis showed a higher sperm mitochondrial activity during the dry season (DS), where the CD and MX races with the highest proportion of cells with mitochondrial activity. Higher acrosomal integrity occurred during DS and higher membrane functionality during RS. By computerized analysis there was a higher percentage of spermatozoa with non-progressive motility (NPM) during RS and higher frequency of tail beats (BCF).

Keywords: semen, cryopreservation, germplasm bank

1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos é realizada no Brasil desde a época da colonização, com primeiro registro em 1535, quando foi introduzida no território nacional pelos primeiros exploradores portugueses (SEAPA, 2006).

A caprinocultura tem crescido bastante nos últimos anos como fonte de renda à pequenos produtores, sendo o Nordeste a região de maior concentração de caprinos no Brasil (ANDRIOLI et al., 2002), representando uma alternativa de trabalho e renda, visto a produção de alimentos de alto valor biológico (leite, carne e vísceras), bem como de pele de excelente qualidade, além da adaptabilidade dos animais ao ecossistema local (MORAES NETO et al., 2003).

No Nordeste, a grande maioria dos caprinocultores adota uma criação de subsistência, com manejo extensivo e explora basicamente carne e pele (PEDROSA et al., 2003). Além disso, o manejo sanitário é precário e a mortalidade de animais, principalmente de jovens, é alta, o que compromete seriamente o desenvolvimento da atividade (FILGUEIRA et al., 2009).

A utilização de biotécnicas reprodutivas visando à melhoria genética do rebanho vem crescendo nos últimos anos, mas em ritmo lento devido ao baixo nível de tecnificação da produção e de investimentos, principalmente dos pequenos produtores, além do arrefecimento do estímulo ao uso dessas biotécnicas por conta dos resultados insatisfatórios gerados pela sua utilização inadequada.

Dentre os fatores que interferem na eficiência do uso de biotécnicas reprodutivas em caprinos e na taxa de prenhez está na necessidade de infraestrutura, que possibilite alcançar bons resultados, assim como na formação de inseminadores, a contaminação das fêmeas, quando é utilizado o sêmen de um reprodutor não testado do ponto de vista sanitário e a redução da qualidade do rebanho, quando se utiliza um macho com características genéticas inferiores à média encontrada na população (TRALDI, 1994).

Dentro desta perspectiva, há ampla necessidade de dar assistência à reprodução destes animais, seja para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, ou para a multiplicação mais eficiente dos genótipos (FONSECA, 2005).

Através da criopreservação de sêmen e de embriões, será possível no futuro, resgatar populações que, por algum motivo, possam ter se extinguido e que tenham importantes características para a pecuária nacional. Nestas coleções, poderá se buscar a variabilidade necessária e características de adaptabilidade às intempéries da natureza que visem aumentar a

produção ou acrescentar genes de interesse econômico às raças comerciais (HIEMSTRA et al., 2005).

Nessa concepção são reconhecidos pelo menos cinco ecotipos crioulos no país: Canindé, Gurguéia, Marota, Moxotó e Repartida. Destes, apenas o Canindé e o Moxotó são reconhecidos como raças. Estes animais, naturalizados no Nordeste brasileiro, desenvolveram características adaptativas importantes (BRITO et al., 2008). Ao longo dos anos adaptaram-se ao clima, com altas temperaturas, pouca oferta de alimentos e água, adquirindo resistência às condições desfavoráveis da região e mantendo-se férteis e prolíficos mesmo em condições adversas (RÊGO et al., 2006).

Dessa forma, é de extrema importância a avaliação da qualidade do sêmen de caprinos nos aspectos físico e morfológico, que permitam a utilização segura em programas de inseminação artificial e nas demais biotécnicas reprodutivas, assim como para criopreservação, mantendo um banco de germoplasma de raças localmente adaptadas de grande interesse biológico, produtivo e cultural.

Este valioso material genético poderá vir a ser utilizado para restabelecer uma raça em processo de extinção, desenvolver um novo grupamento genético, dar suporte a programas de conservação *in vivo* e fornecer material para estudos moleculares visando à identificação de genes de importância econômica (RAMOS et al., 2009).

Portanto esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da época do ano sobre as características físicas e morfológicas do sêmen caprino criopreservado, visando à conservação do material genético de raças localmente adaptadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomofisiologia da reprodução em caprinos

A duração da estação reprodutiva varia de acordo com a extensão do dia, com a raça e com a nutrição. Essa estacionalidade é governada pelo fotoperiodismo com a atividade estral começando durante o período em que diminui a duração de luz (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em regiões temperadas a estacionalidade reprodutiva dos animais é atribuída à combinação entre fotoperíodo e temperatura, já em regiões tropicais o efeito do ambiente parece estar mais relacionado à chuva e ao seu efeito na quantidade e qualidade da forragem (REGE et al., 2000).

A puberdade no macho pode ser descrita como o momento em que o mesmo atinge a capacidade de fertilizar uma fêmea (DARAMOLA et al., 2007). O momento de ocorrência da puberdade em caprinos machos é variável e ocorre geralmente, entre 4 a 6 meses de idade, quando eles estão com 40 a 60% do peso adulto. Essa idade é influenciada por diversos fatores externos como: fotoperíodo, raça, estado nutricional e fatores sociais (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As gônadas do macho, os testículos, têm duas funções principais: produção de células germinais (espermatozoides) que transmitem os genes do macho para os descendentes e a produção de andrógenos, que fornecem as características sexuais secundárias (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). Durante a vida fetal, os testículos migram para um divertículo do abdômen chamado escroto, que nos caprinos é pendular, de pele delgada e elástica, revestida internamente pela túnica dartos, com presença marcante de glândulas sudoríparas e sebáceas (AISEN, 2008). Esta morfologia tem a função primordial de manter a temperatura testicular de 4 a 7°C inferior à temperatura corpórea, condição indispensável para o desenvolvimento da espermatogênese. A troca de calor, necessária à termorregulação, é realizada através do plexo pampiniforme onde ocorre a aproximação do sangue arterial com o venoso (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Além dos testículos, o aparelho reprodutor dos machos caprinos é constituído pelo epidídimo, o qual é dividido em cabeça, corpo e cauda, importantes no transporte e armazenamento de espermatozoides produzidos no testículo. As glândulas sexuais acessórias, tais como: vesículas seminais, glândulas bulbo uretrais e próstata, encontram-se no macho caprino e desempenham importante papel de produção do plasma seminal, fundamental para a sobrevivência espermática no ejaculado (GRANADOS et al., 2006).

Os espermatozoides são formados a partir do desenvolvimento das células germinativas presentes no interior dos túbulos seminíferos, estes se derivam a partir das espermatogônias que

se diferenciam em espermatócitos primários, secundários e espermátides até chegarem a espermatozoides. Essa sequência de eventos denominada espermatogênese é regulada pela secreção de testosterona a partir das células de Leydig (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As células germinativas sofrem uma série contínua de divisões celulares e modificações de desenvolvimento, começando na periferia e progredindo em direção ao lúmen tubular. As espermatogônias dividem-se diversas vezes até formarem os espermatócitos. Os espermatócitos passam pelo processo de meiose, reduzindo o conteúdo de DNA à metade das células somáticas. Esta série de divisões celulares, incluindo a proliferação das espermatogônias é conhecida por espermatocitogênese (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As espermatogônias dividem-se para formar os espermatócitos primários. Estes passam por progressivas modificações nucleares da prófase meiótica, antes da divisão para formar espermatócitos secundários e se dividem novamente (Meiose II) para formar as espermátides. As espermátides são transformadas em espermatozoides por uma série de modificações morfológicas progressivas conhecidas coletivamente por espermiogênese. As modificações incluem condensação da cromatina nuclear, formação da cauda do espermatozoide ou aparelho flagelar e desenvolvimento do capuchão acrossomático. A liberação de células germinativas formadas para o lúmen dos túbulos seminíferos é conhecida por espermição (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os espermatozoides recém-formados seguem pela rete testes e adentram o epidídimo através dos ductos eferentes. Durante a passagem através do epidídimo, os espermatozoides sofrem uma série de alterações bioquímicas para se tornarem espermatozoides móveis capazes de fertilizar, através do contato com as secreções epididimárias (O'DONNELL et al., 2001).

2.2 Considerações entre época do ano e qualidade seminal

Dentre os recursos genéticos disponíveis para produção animal em regiões áridas e semiáridas, enfatiza-se o potencial das raças caprinas nativas (GOMES et al., 2008) tendo-se como pressuposto teórico que os séculos de pressão de seleção natural promoveram elevado valor adaptativo em relação a esses ambientes, com expectativa de maior resistência às condições ambientais (LUCENA et al., 2013). Animais homeotérmicos possuem mecanismos termorreguladores autônomos que permitem ao organismo evitar variações em sua temperatura corporal, mesmo que a temperatura ambiente sofra grandes alterações (SCARPELLINI; BÍCEGO, 2010).

No Nordeste brasileiro os caprinos assumem a condição de poliéstricos contínuos, porém observa-se uma determinada estacionalidade produtiva que depende de uma série de variáveis extrínsecas (fotoperíodo, latitude, temperatura e alimentação) e intrínsecas (raça, peso, idade) (NUNES et al., 1997).

A qualidade do sêmen determina a eficiência reprodutiva do macho durante o ano, aspecto este que pode variar de acordo com a raça, localização geográfica e época do ano (KARAGIANNIDIS et al., 2000). Este último fator exerce forte influência na qualidade do sêmen de caprinos (BARKAWI et al., 2006).

O estresse provocado pelo calor interfere na função reprodutiva do macho caprino (SILVA et al., 2005). A temperatura ambiente é o fator de maior importância na espermatogênese dos machos de qualquer espécie e, quando muito elevada, em torno de 34,5°C, é prejudicial tanto nas fases de formação dos espermatozoides quanto nas células já formadas e em trânsito epididimário (MIES FILHO, 1987).

A elevação da temperatura ambiental provoca um aquecimento dos testículos, aumento do metabolismo e da demanda de oxigênio pelas células, mas devido à limitação do fluxo sanguíneo, ocorre hipóxia e degeneração seminal (SETCHELL, 1998), redução na fertilidade do macho, alterações na síntese de proteínas e expressão de genes nas células germinativas e de Sertoli (IKEDA et al., 1999; KUMAGAI et al., 2000).

Características seminais e circunferência escrotal apresentam grande variação entre raças e até mesmo entre indivíduos da mesma raça (LANGFORD et al., 1998). Mudança de estação afeta tanto a qualidade quanto a quantidade de sêmen em toda a extensão do ano (CHEMINEAU et al., 1992).

2.3 Coleta e avaliação da qualidade seminal

Dentre os métodos de coleta de sêmen para avaliação em caprinos, estão o da vagina artificial, eletroejaculação e o método do coletor vaginal. O método da vagina artificial associado ao uso de um manequim ou fêmea em cio é o mais empregado e o que obtém as características mais próximas do natural (MIES FILHO, 1987).

A avaliação da aptidão reprodutiva de um macho destinado à reprodução fundamenta-se na observação da saúde geral, saúde hereditária, saúde genital, *potentia coeundi* (capacidade de cópula) e *potentia generandi* (capacidade de fertilização) (CBRA, 2013). O espermograma assume grande importância, pois permite a valorização da qualidade do reprodutor, visto que ele demonstra sua *potentia generandi*. O exame do sêmen é feito inicialmente de forma

macroscópica, sem auxílio de qualquer instrumento. Em seguida, o sêmen é avaliado por métodos laboratoriais e microscopia (REICHENBACH et al., 2008).

2.3.1 Avaliação clássica do sêmen caprino

A avaliação *in vitro* do sêmen é uma ferramenta importante na determinação da capacidade reprodutiva de um macho como reprodutor, em virtude de complementar as informações obtidas durante a realização do exame clínico. Tal contribuição tem valor diagnóstico na avaliação da função testicular, epididimária e de todo sistema reprodutor do macho, auxiliando na identificação de casos de subfertilidade ou infertilidade (BATISTA; GUERRA, 2010).

Segundo a avaliação convencional do ejaculado, para as diversas espécies, observam-se as características físicas: volume, aspecto, turbilhão ou movimento de massa, motilidade total e motilidade progressiva individual, vigor e concentração, além da morfologia espermática e seus defeitos (maiores e menores) (CBRA, 2013).

O aspecto é a avaliação macroscópica do ejaculado, onde normalmente são avaliadas a cor e a aparência. Estes parâmetros estão ligados principalmente à concentração dos espermatozoides, mas também a uma eventual presença de sangue, pus, urina, células epiteliais e detritos (CBRA, 2013).

O volume do sêmen é expresso em mililitros (mL). É um parâmetro bastante variável, dependendo do método de coleta de sêmen. O método da vagina artificial apresentará valores mais próximos dos fisiológicos. Para cada espécie a variação entre animais pode ser devido ao método de coleta, ao regime de serviços prévio à coleta, ao tempo de excitação, dentre outros (SALVIANO; SOUZA, 2008).

O turbilhão ou movimento de massa é o movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen *in natura*. A intensidade do movimento é resultante da interação da motilidade, do vigor e da concentração espermática. A interpretação baseia-se em uma escala de zero a cinco, onde zero é a ausência de turbilhão e cinco o valor máximo dado a um acentuado movimento de massa (NUNES, 2002).

A motilidade é expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozoides móveis. Segundo Mies Filho (1987), esta é uma das principais características que devem ser levadas em conta no exame de um sêmen, para avaliação de sua capacidade fecundante. Não raramente constata-se no bode saudável alta motilidade com 80% ou mais de células com movimento retilíneo progressivo (CBRA, 2013). De acordo com Neves et al. (2008), as

amostras de sêmen caprino devem apresentar um mínimo de 60% de motilidade para serem utilizadas imediatamente ou criopreservadas.

O vigor representa a força do movimento que acaba influenciando a velocidade com que os espermatozoides se movimentam. O mesmo é classificado de zero a cinco (CBRA, 2013).

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por milímetro (mm^3) ou centímetro cúbico ($\text{cm}^3 = \text{mL}$). O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células na câmara de Neubauer, porém a espectrofotometria também pode ser utilizada para essa finalidade (CBRA, 2013).

A morfologia espermática determina a percentagem de espermatozoides patológicos dentro da população, não devendo ultrapassar os 20%, nos pequenos ruminantes, principalmente para utilização em inseminação artificial (CBRA, 2013), pois os espermatozoides mortos e anormais apresentam efeitos adversos sobre a fertilidade potencial do sêmen (MAXWELL; WATSON, 1996).

As limitações destes métodos incluem subjetividade, variabilidade, reduzido número de espermatozoides analisados e pobre correlação com o potencial fertilizante desses gametas (VERSTEGEN et al., 2002).

Novas técnicas têm sido desenvolvidas e estudadas juntamente com as análises de rotina (análise física e morfológica do sêmen) e com os testes complementares já utilizados para avaliação andrológica para melhor compreensão de seus resultados (LENA, 1997). Esses testes mensuram a integridade da célula, condição básica para garantir a capacidade fertilizante de um espermatozoide (MOCÉ; GRAHAM, 2008).

2.3.2 Testes complementares de avaliação da integridade espermática

2.3.2.1 Análise estrutural e funcional de espermatozoides

A necessidade de testes para prever a capacidade reprodutiva de reprodutores vem crescendo, principalmente com a aquisição de machos com potencial reprodutivo comprovado. Servem de ferramenta para aumentar os índices de produtividade na caprinocultura nacional (RIBEIRO, 1997).

A funcionalidade da membrana pode ser testada, dentre outros, pelo teste hiposmótico (JEYENDRAN et al., 1984). Esse teste baseia-se na observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos

extra e intracelulares (SANTOS et al., 2001), sendo um indicativo de que o transporte de água através da membrana está ocorrendo normalmente (INAMASSU et al., 1999).

Em caprinos, Fonseca et al. (2001), utilizando uma solução hiposmótica formulada pela combinação de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) em água destilada, testaram osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol/L. Os autores observaram que a maior percentagem de espermatozoides reativos ao teste e com um maior grau de reação (dobramento de cauda e edema) foi encontrada em solução hiposmótica a 125 e 150mOsmol/L.

O teste é realizado sob microscopia de contraste de fase, no qual os espermatozoides são submetidos a um meio hipotônico e procede-se à contagem de 200 células, em pelo menos 5 campos diferentes, sendo os espermatozoides classificados em reagidos (cauda enrolada) ou não reagidos (cauda reta). Este influxo de água aumenta o volume da célula e provoca a dilatação da membrana plasmática. A cauda é particularmente susceptível a esta condição, torcendo-se em helicoidal (reação positiva) (FONSECA et al., 2005).

A utilização de sondas fluorescentes permite avaliar a integridade da membrana plasmática, através da combinação do Iodeto de Propídio com o Diacetato de Carboxifluoresceína. O Diacetato de Carboxifluoresceína, por conter radicais acetil, consegue transpor a membrana intacta, sendo imediatamente desacetilada por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável e fazendo com que as células íntegras corem em verde. O Iodeto de Propídio somente penetra através de células que contenham membrana plasmática lesada, tendo afinidade pelo DNA e corando o núcleo da célula em vermelho (ARRUDA; CELEGHINI, 2003).

A técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células, detectar integridade estrutural de forma clara (CELEGHINI, 2005), além de possibilitar a avaliação de vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2007).

Para que ocorra a fecundação dos oócitos, os espermatozoides precisam sofrer reação acrossômica, mas para tanto precisam estar previamente capacitados para poderem responder ao estímulo da zona pelúcida que desencadeará o processo de reação acrossômica. Para que ocorra esta alteração, o acrossoma deve estar com perfeita integridade estrutural e funcional (YANG et al., 1998).

A integridade acrossomal pode ser mensurada por diferentes métodos, todavia os mais comumente usados são aqueles que utilizam isotiocianato de fluoresceínas conjugadas a lecitinas, tais como: *Peanut Agglutinin* (FITC-PNA) ou *Pisum Sativum Agglutinin* (FITC-PSA) (HERRERA et al., 2002). Estas lecitinas ligam-se especificamente a conteúdos acrossomais por

meio da interação com glicoconjugados da membrana acrossomal externa (FITC-PNA) ou com grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (FITC-PSA) (GILLAN et al., 2005; SILVA; GADELLA, 2006).

É necessário que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (PAPAIANO et al., 1997; CONNELL et al., 2002). Dessa forma, é preciso avaliar a atividade mitocondrial nos espermatozoides para garantir uma adequada mobilidade. Nesse sentido, tem evoluído bastante o uso de sondas fluorescentes para proceder este tipo de análise (BATISTA; GUERRA, 2010).

Vários são os corantes utilizados, dentre estes, o corante JC-1 não apenas tem a habilidade para distinguir a mitocôndria funcional daquela não funcional, mas permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam observados, visto que mitocôndrias com respiração pouco ativa acumula pouco corante e fluorescem em verde, ao passo que mitocôndrias com respiração bastante ativa acumulam mais corante, formando um agregado e fluorescendo em laranja (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

2.3.3 Análise computadorizada do sêmen

Análises espermáticas convencionais por microscopia de luz podem ser influenciadas pelo observador, bem como necessitar de muito tempo na preparação das amostras ou na análise, resultando em um número relativamente pequeno de espermatozoides avaliados (BATISTA; GUERRA, 2010).

Na busca de maior objetividade na avaliação da motilidade espermática, vários métodos têm sido propostos, entre eles o sistema de análise computadorizada do movimento espermático, denominado “Computer Assisted Sperm Analysis” (CASA). Esse tipo de análise permite uma avaliação mais exata e objetiva da motilidade, fornece informações precisas e significativas da cinética da célula espermática (VERSTEGEN et al., 2002; COX et al., 2006) e determina não somente a percentagem de células móveis na amostra, mas também quantifica características específicas do movimento espermático (GARNER, 1997).

O CASA é um sistema automático utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações precisas e significativas do movimento individual de cada célula, a partir da reconstrução da trajetória da cabeça do espermatozoide, bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004). Vários estudos em caprinos para avaliar diferentes protocolos de congelação (KAZDROWSKI et al., 2007) ou

mesmo a congelabilidade de amostras isoladas de sêmen têm utilizado este método de avaliação (DORADO et al., 2009).

Este sistema oferece informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados. Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total (MT - %), motilidade progressiva (MP - %), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %) e índice de oscilação ou wobble (WOB - %), velocidade curvilinear (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$) e velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF - Hz), amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH - μm) (VERSTEGEN et al., 2002).

É uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos experimentais (FARREL et al., 1996), na pesquisa de novos diluidores seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamento (AMANN; KATZ, 2004), assim como na quantificação da hiperativação, no estabelecimento da relação entre qualidade do sêmen do doador e a verdadeira fertilidade da amostra e nas avaliações gerais da conveniência do uso de machos para reprodução (FARREL et al., 1996; VERSTEGEN et al., 2002).

Embora o sistema tenha muitas vantagens, ele apresenta algumas desvantagens que tornam seu uso limitado, tais como o elevado custo do equipamento e a necessidade de validação, o controle de qualidade e a padronização das avaliações realizadas (DAVIS; KATZ, 1993).

2.4 Criopreservação seminal

A criopreservação proporciona uma estocagem do sêmen de animais de alto valor por tempo indeterminado, maximizando assim o poder reprodutivo do macho e permitindo seu uso mesmo após a morte do animal. Além disso, reduz os custos com criação de reprodutores, tendo em vista que se pode adquirir sêmen congelado com qualidade comprovada (CASTELO et al., 2008).

Para garantir o sucesso da criopreservação é necessário ter o conhecimento não somente do diluente e do crioprotetor apropriado, das taxas de diluição, resfriamento ou descongelação, mas também o conhecimento da própria fisiologia espermática da espécie, que é essencial para a recuperação espermática máxima após a descongelação e, conseqüentemente, para a obtenção de altas taxas de fertilidade (PURDY, 2006).

Para criopreservação é importante a diluição do ejaculado através de diluente adicionado de crioprotetores. A taxa de diluição do sêmen caprino pode variar entre 1:1 a 1:23 (sêmen/diluente), sendo passível de utilização de uma dose prática de 1:9 quando não se dispõe de meios para determinar, com eficácia, a concentração pós-diluição de aproximadamente 200×10^6 espermatozoides/mL (NUNES, 2002).

De acordo com Castelo et al. (2008), a diluição do sêmen caprino deve ser realizada logo depois da coleta do sêmen, na qual tanto o ejaculado quanto o diluente devem ser mantidos em banho-maria a 37°C para garantir que ambos estejam à mesma temperatura.

Para que um diluente seja usado na criopreservação de sêmen caprino ele deve ser constituído por substâncias tampão, como o Tris e citrato de sódio, fontes energéticas, como a glicose e a frutose, crioprotetores externos como a gema de ovo ou o leite, ou internos, como o glicerol e o etilenoglicol, bem como os antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados (GIBBONS, 2002).

Porém, os processos de congelação e descongelação do sêmen induzem danos bioquímicos, funcionais e ultra-estruturais aos espermatozoides (WATSON, 2000), resultando em redução da motilidade, integridade de membrana e capacidade de fertilização (PURDY, 2006), o que pode levar a decréscimos de aproximadamente 50% na motilidade espermática após o procedimento de descongelação (CHOE et al., 2006; KAZDROWSKI et al., 2007). Os danos físicos que acometem os espermatozoides durante o processo de congelação podem se localizar nas membranas plasmática e acrossomal, na peça intermediária ou no axonema (SALAMON; MAXWELL, 1995).

A congelação induz injúrias diretas as células, explicadas por duas hipóteses dependendo da taxa de congelação do sistema: a formação de gelo intracelular quando congelado rapidamente e o “efeito solução” quando a congelação é lenta (MAZUR, 1970). Quando a taxa de congelação é rápida, a água intracelular congela e forma cristais de gelo, letais para a célula. Também, quando a taxa de congelação é lenta os cristais de gelo se formam na solução extracelular primeiro, o que gera um aumento na concentração de eletrólitos da fração não congelada. O aumento na concentração induz, conseqüentemente, desidratação celular através de uma diferença de pressão osmótica, que pode levar a elevadas taxas de toxicidade ou injúria celular, o que é denominado de “efeito solução” (FAHY, 1980).

É necessário obedecer ao tempo de equilíbrio, que é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com o glicerol e todos os demais componentes do diluidor, previamente à congelação. Durante esse período ocorre o equilíbrio osmótico entre o

meio intracelular espermático e o extracelular formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no meio diluidor (SALAMON; MAXWELL, 2000).

A influência do fator individual tem sido avaliada visando analisar a capacidade de criopreservação espermática, enfatizando a necessidade de avaliação prévia tanto do reprodutor quanto de diferentes ejaculados de um mesmo animal (WINDSOR, 1997).

2.5 Conservação de recursos genéticos locais

Os caprinos foram introduzidos no Brasil pelos portugueses durante o processo de colonização, passando por um longo período de seleção natural e adaptação ao Semiárido, formando assim, vários grupamentos genéticos como Azul, Canindé, Graúna, Marota, Moxotó, Nambi, Repartido, dentre outros. Estes grupos constituem os ecotipos brasileiros e estão localizados principalmente no Nordeste, onde são criados de forma extensiva e semi-extensiva, quase sempre aliada à agricultura familiar, para a produção de carne, pele e leite. Esses animais apresentam características marcantes de adaptabilidade a ambientes menos favoráveis, o que tem levado às diversas citações na literatura como de primordial importância para o desenvolvimento de regiões de baixa oferta de alimentos e clima adverso, como o Semiárido (DEVENDRA, 2002).

O efetivo populacional de raças em perigo de extinção necessita do monitoramento da diversidade e de programas de conservação para a sua manutenção (HIEMSTRA et al., 2005).

A conservação de recursos genéticos animais visa conservar raças de animais domésticos que, embora possam ter suas origens com certa proximidade genética, sofreram isolamento geográfico e passaram por um processo de seleção natural em diferentes nichos ecológicos, adquirindo características de adaptação a ecossistemas específicos (MARIANTE et al., 2008).

Através da criopreservação de sêmen e de embriões, será possível no futuro, resgatar populações que, por algum motivo, possam ter se extinguido e que tenham importantes características para a pecuária nacional. Nestas coleções, poderá se buscar a variabilidade necessária e características de adaptabilidade às intempéries da natureza que visem aumentar a produção ou acrescentar genes de interesse econômico às raças comerciais (HIEMSTRA et al., 2005).

Existem várias metodologias utilizadas para a conservação dos recursos genéticos animais: (1) conservação *in situ*, a partir da implantação de núcleos de conservação nas regiões de origem dessas raças; (2) conservação *ex situ in vivo*, na qual os animais são conservados fora

de seu *habitat* original, ou seja, no caso das raças naturalizadas, longe do local onde eles foram submetidos à ação da seleção natural; e (3) conservação *ex situ in vitro*, que se baseia na utilização de modernas técnicas criogênicas de armazenamento de material genético como sêmen e embriões (MARIANTE et al., 2011).

Programas de conservação *in situ* e *ex situ* para raças em risco de extinção podem ser beneficiados por modernas técnicas de biotecnologias da reprodução, incluindo inseminação artificial com sêmen congelado, superovulação e transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões, micromanipulação de gametas/embriões, sexagem de sêmen/embriões e banco de genoma (ANDRABI; MAXWELL, 2007).

A conservação e o desenvolvimento de raças localmente adaptadas é de grande importância porque estas utilizam alimentação de baixa qualidade, são menos susceptíveis ao estresse climático, são mais resistentes a doenças e parasitas presentes em suas regiões, e representam uma fonte única de genes a serem utilizados para aumento de características produtivas e para a manutenção da saúde em animais de raças comerciais. A utilização e o desenvolvimento de raças locais já adaptadas a ambientes hostis, e que demandam um manejo mínimo, são de extrema importância em alguns ecossistemas. Espera-se que animais geneticamente adaptados a essas condições sejam mais produtivos a baixos custos, sendo, portanto, fundamentais para comunidades locais (CARDELLINO, 2005).

O sucesso da conservação de recursos genéticos na espécie caprina passa pelo enriquecimento adequado dos bancos de germoplasma e, com isso, pela criopreservação de sêmen e de embriões. A evolução e a adaptação dos protocolos utilizados para coleta e criopreservação de sêmen e de embriões em raças adaptadas são essenciais para aumento da eficiência dos programas de enriquecimento de germoplasma (RAMOS et al., 2011).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISEN, G. A. **Reprodução Ovina e Caprina**. São Paulo: MedVet, 2008.

AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology** [S.l.], v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 223-243, 2007.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA SOBRINHO, P. A.; PINHEIRO, R. R.; SALLES, H. O. Transferência de Embriões em cabras naturalmente infectadas pelo Lentivirus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 5, p. 215-220, 2002.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 31, p. 230-231, 2003. Suplemento.

BARKAWI, A. H.; ELSAYED, E. H.; ASHOUR, G.; SHELATA, E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. **Small Ruminant Research**, [S.l.] v. 66, n. 1-3, p. 209-213, 2006.

BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 125-132, 2010.

BRITO, R. L. L.; FARIAS, J. L. S.; SANTOS, D. O.; ARAGÃO, D. A.; RÊGO, J. P. A.; BRITO, I. F.; PINHEIRO, A. A. Avaliação do comportamento reprodutivo de caprinos naturalizados como doadores de sêmen. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2008, Aracajú, **Resumos...** Aracajú: CNPA, 2008.

CARDELLINO, R. A. Status of the world's livestock genetic resources: Preparation of the first report on the state of the world's animal genetic resources. In: The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry animal and fishery genetic resources. INTERNATIONAL WORKSHOP, 2005, Torino. **Proceedings...** Torino: FAO, 2005. p. 1-6.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.l.], v. 2, p. 67-75, 2008.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; DELGADDLLO, J. A. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. **Animal Reproduction Science**, v. 30, p. 157- 184, 1992.

CHOE, C. Y.; KIM, J. G.; CHO, S. R.; SON, D. S.; KIM, Y. K.; BALASUBRAMANIAN, S., CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 55-60, 2006.

CONNELL, M. O.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704-709, 2002.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.

DARAMOLA, J. O.; ADELOYE, A. A.; FATOBA, T. A.; SOLADOYE, A. O. Induction of puberty in West African Buck-kids with exogenous melatonin. **Livestock Reseach for Rural Development**, [S.l.], v. 19, n. 9, p. 90-97, 2007.

DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Operational standards for CASA instruments. **Journal of Andrology**, v.14, p.385-395, 1993.

DEVENDRA, C. Potential, productivity from small ruminants and contribution to improved livelihoods and rural growth in developing countries. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. p. 246-269.

DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, A.; RODRÍGUEZ, I. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 112, p. 150-157, 2009.

FAHY, G. M. Analysis of “solution effects” injury equations for calculating phase diagram information for the ternary systems NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. **Biophysical Journal**, v. 32, p. 837–850, 1980.

FARREL, P. B.; FOOTE, R. N.; MCARDLE, M. M.; TROUERN-TREND, V. L.; TARDIF, A. L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v. 17, p. 293-300, 1996.

FILGUEIRA, T. M. B.; AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; SOUZA, W. J.; FONSECA, Z. A. A. S. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da

chapada do apodi. Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável, v. 4, n. 2, p. 64 – 67, 2009.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: CBRA, 2005. CD-ROM.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; ROVAY, H.; BORGES, A.M.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V; FRAGA, D.B.M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 25, n. 3, p. 436-457, 2001.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 2, p. 139-144, 2005.

FUNDAÇÃO CEPRO. Anuário estatístico do Piauí, Teresina, 2001. Disponível em: <http://www.cepro.pi.gov.br/download/201102/CEPRO25_b744851c89.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2015.

GARNER, D. L. Ancillary tests of bull semen quality. **Veterinary Clinics of North America**, v. 13, p. 313-327, 1997.

GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, [S.l.], v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GOMES, C. A. V.; FURTADO, D. A.; MEDEIROS, A. N.; PIMENTA FILHO, E. C.; LIMA JÚNIOR, V. L. Efeito do ambiente térmico e níveis de suplementação nos parâmetros fisiológicos de caprinos Moxotó. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 213-219, 2008.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, [S.l.], v. 64, p. 492-504, 2005.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. **Aspectos Gerais da Reprodução de Caprinos e Ovinos**. Campo dos Goytacazes: Projeto PROEX/UENF, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004.

HERRERA, J.; FIERRO, R.; ZAYAS, H.; CONEJO, J.; JIMÉNEZ, I.; GARCÍA, A.; BETANCOURT, M. Acrosome reaction infertile and sub fertile boar sperm. **Archives of Andrology**, v.48, p.133-139, 2002.

HIEMSTRA, S. J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Rome: FAO, 2005. p. 25-35.

IKEDA, M.; KODAMA, H.; FUKUDA, J. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cells apoptosis induced by heat stress. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 393-399, 1999.

INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.l.], v. 23, p. 302-304, 1999.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S.l.], v. 70, p. 219-228, 1984.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goats bucks born raised in Greece. **Theriogenology**, [S.l.], v. 53, n. 6, p. 1285-1293, 2000.

KAZDROWSKI, R.; DUBIEL, A.; BIELAS, W.; DZIECIOL, M. Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of computer-assisted semen analysis system. **Acta Veterinaria Brno**, [S.l.], v. 76, p. 601-604, 2007.

KUMAGAI, J.; FUKUDA, J.; KODAMA, H. Germ cell-specific shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 3073-3078, 2000.

LANGFORD, G. A.; SHRESTHA, J. N. B.; SANFORD, L. M.; MARCUS, G. J. Reproductive hormone levels of early post pubertal ram lambs in relation to breed, adult testis size and semen quality. **Small Ruminant Research**, v. 29, p. 225-231, 1998.

LENA, M. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, [S.l.], v. 48, p. 523-530, 1997.

LUCENA, L. F. A.; FURTADO, D. A.; NASCIMENTO, J. W. B.; MEDEIROS, A. N.; SOUZA, B. B. Respostas fisiológicas de caprinos nativos mantidos em temperatura termoneutra e em estresse térmico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 6, p. 672-679, 2013.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal reproduction science**, [S.l.], v. 105, p. 104-118, 2008.

MORAES NETO, O. T.; RODRIGUES, A.; ALBUQUERQUE A. C. A.; MAYER, S. **Manual de capacitação de agentes de desenvolvimento rural (ADRs) para a Caprinovincultura**. João Pessoa: SEBRAE - PB, 2003.

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAIVA, S. R.; RAMOS, A. F. Managing genetic diversity and society needs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 127-136, 2008.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 64-68, 2011.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, p. 939-949, 1970.

NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Ed. Roca. 2008, p. 77-97.

NUNES, J. F.; CIRIACO, A. L. T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2. ed. Fortaleza: LCR, 1997.

NUNES, J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2002. p. 111-125.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

PAPAIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S.; HYNES, N.; RYAN, M. P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, p. 299-312, 1997.

PEDROSA, K. Y. F.; BARRETO JÚNIOR, R. A.; COSTA, E. S.; LEITE, A. I.; PAULA, V. V. P. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte. **Caatinga**, v. 16, n. 1-2, p. 17-21, 2003.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

RAMOS, A. F.; NASCIMENTO, N. V.; SILVA, A. V. R.; PAIVA NETO, M. A.; EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAIVA, S. R.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. S. Qualidade do sêmen bovino estocado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. In: SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE CONSERVACIÓN E UTILIZACIÓN DE RECURSOS ZOOGENÉTICOS, 10., 2009, Palmira. **Memórias...** Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 2009. p. 499-502.

RAMOS, A. F.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: desafios e perspectivas da conservação de caprinos no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 104-107, 2011.

REGE, J. E. O.; TOE, F.; MUKASA-MUGERWA. E.; TEMBELY, S.; ANINDO, D.; BAKER, R. L.; LAHLOU-KASSI, A. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in Ram lambs. **Small Ruminant Research**, v.37, p. 173-187, 2000.

RÊGO, J. P. A.; FACÓ, O.; VILLELA, L. C. V.; SILVA, F. L. R.; PINHEIRO, A. A.; SANTOS, D. O. BGCON – Banco de Germoplasma de Caprinos e Ovinos naturalizados: Uma alternativa para inventariar a infra-estrutura dos recursos genéticos existentes. In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E OVINOCULTURA BRASILEIRAS, 5., 2006. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Caprinos e Embrapa Gado de Corte, 2006. CD-ROM.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura**: criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 1997.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 159-167, 2008.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A. M.; ROVAY, H.; GORETTI, R. G.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V. V.; FRAGA, D. B. M. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SEAPA - SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Superintendência de Economia Agrícola. Caprinos. Belo Horizonte, 2006.

SETCHELL, B. P. The parkers lecture: Heat and testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 179-194, 1998.

SCARPELLINI, C. S.; BÍCEGO, K. C. Regulação da temperatura corporal em diferentes estados térmicos: Ênfase na anapirexia. **Revista da Biologia**, v. 5, p. 1-6, 2010.

SILVA, G. A.; SOUZA, B. B.; PEÑA ALFARO, C. E.; AZEVEDO, S. A.; AZEVEDO NETO J.; SILVA, E. M. N.; SILVA, A. K. B. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semiárido paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v. 1, p. 7-14, 2005.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. J.; REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 603-614.

TRALDI, A. S. **Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos**. [S.l.]: Manual técnico, 1994.

VERSTEGEN J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, [S.l.], v. 57, p. 149-179, 2002.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 61, p. 481-492, 2000.

WINDSOR, D. P. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination on Merino ewes. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.21-29, 1997.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANELA, M. Controlo f oocyte maturation in cows: biological factors. **Theriogenology**, [S.l.], v. 49, p. 189-317, 1998.

CAPITULO I*

1 Efeito da época do ano sobre as características físicas e morfológicas do sêmen
2 criopreservado de caprinos Azul, Canindé e Moxotó

3
4 [*Effect of the year season on the physical and morphological characteristics of the*
5 *cryopreserved semen of Azul, Canindé and Moxotó goats*]

6
7 J. H. L. Silva^{1*}, J. A. T. Souza²

8
9 ¹Mestrando em Ciência Animal – CCA/UFPI – Teresina, PI

10 ²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, CCA/UFPI

11 Campus da Socopo, 64049-550 – Teresina, PI

12 *e-mail: jefflsilva.jl@gmail.com

13 14 15 **RESUMO**

16
17 O presente trabalho visa analisar o efeito da época do ano sobre as características físicas
18 e morfológicas do sêmen criopreservado de caprinos localmente adaptados visando à
19 conservação do material genético dessas raças. Foram utilizados 18 reprodutores caprinos
20 adultos, com idade entre 2 e 5 anos, das raças Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX).
21 As coletas de sêmen foram realizadas no turno da manhã, pelo método da vagina artificial,
22 com auxílio de fêmea estroginizada. Após a formação de um *pool* dos ejaculados, uma
23 alíquota de cada amostra foi avaliada quanto aos parâmetros seminais físicos. Outra
24 alíquota foi diluída em solução de formol salino para mensuração da concentração e
25 análise morfológica. Após a diluição em meio Tris-Gema o sêmen foi congelado em
26 sistema automatizado. Após a descongelação, foi realizado o teste de termorresistência
27 (TTR) em 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelação, teste de funcionalidade da
28 membrana plasmática (HOST), análise estrutural dos espermatozoides usando sondas
29 fluorescentes e análise da cinética espermática pelo CASA. A análise morfológica foi
30 realizada pela técnica de preparação úmida, distribuindo os defeitos por categoria. O
31 volume de sêmen das raças AZ e MX (0,52 mL; 0,69mL) foram superiores à da raça CD
32 (0,40mL), as raças CD e MX apresentaram vigor espermático (2,95; 3,04) superior à raça
33 AZ (2,5). Na época chuvosa (EC) ocorreu menor percentagem de defeitos de cabeça
34 (0,5%), também na EC ocorreu maior proporção de defeitos totais (10,2%). No TTR,
35 ocorreu maior porcentagem de motilidade e maior vigor na EC. O grupo AZ apresentou
36 menor motilidade e vigor espermático. Houve maior atividade mitocondrial espermática
37 durante a época seca (ES). As raças CD e MX apresentaram maior atividade mitocondrial.
38 Ocorreu maior integridade acrossomal durante a ES e maior funcionalidade de membrana
39 durante a EC. Pelo CASA houve maior percentagem de motilidade não progressiva
40 durante a EC e maior frequência de batimentos de cauda.

41
42 Palavras-chave: sêmen, criopreservação, banco de germoplasma

43

ABSTRACT

The present work aims to analyze the effect of the time of year on the physical and morphological characteristics of cryopreservation semen from locally adapted goats aiming at the conservation of the genetic material of these breeds. Eighteen adult goat breeds, aged between 2 and 5 years old, from the Azul (AZ), Canindé (CD) and Moxotó (MX) breeds were used. The semen collections were performed in the morning shift, using the artificial vagina method, with the aid of estrogenized female. After forming a pool of ejaculates, an aliquot of each sample was evaluated for the physical seminal parameters. Another aliquot was diluted in saline formaldehyde solution to measure concentration and morphological analysis. After dilution in Tris-Gemma medium the semen was frozen in an automated system. After thawing, the thermoresistance test (TTR) was performed at 0, 60, 120 and 180 minutes post-thawing, plasma membrane functionality (HOST), structural analysis of spermatozoa using fluorescent probes and analysis of sperm kinetics by CASA. The morphological analysis was performed by the wet preparation technique, distributing defects by category. The semen volume of the breeds AZ and MX (0.52 mL, 0.69 mL) were higher than the CD (0.40 mL), the CD and MX breeds presented spermatic vigor (2.95; 3.04) higher than Race AZ (2,5). In the rainy season (EC) there was a lower percentage of head defects (0.5%), also in the EC there was a higher proportion of total defects (10.2%). In TTR, there was a higher percentage of motility and greater vigor in the CD. The AZ group presented lower motility and spermatic vigor. There was greater mitochondrial sperm activity during the dry season (ES). The CD and MX races showed higher mitochondrial activity. Greater acrosomal integrity occurred during ES and greater membrane functionality during EC. For CASA, there was a higher percentage of non-progressive motility during EC and higher frequency of tail beats.

Keywords: semen, cryopreservation, germplasm bank

INTRODUÇÃO

73
74

75 A utilização de biotécnicas reprodutivas visando à melhoria genética do rebanho
76 vem crescendo nos últimos anos, mas em ritmo lento devido ao baixo nível de
77 tecnificação da produção e de investimentos, principalmente dos pequenos produtores,
78 além do arrefecimento do estímulo ao uso dessas biotécnicas por conta dos resultados
79 insatisfatórios gerados pela sua utilização inadequada.

80 A qualidade do sêmen determina a eficiência reprodutiva do macho durante o ano,
81 aspecto este que pode variar de acordo com a raça, localização geográfica e época do ano
82 (Karagiannidis *et al.*, 2000). A época do ano exerce forte influência na qualidade do
83 sêmen de caprinos (Barkawi *et al.*, 2006).

84 A criopreservação proporciona uma estocagem do sêmen de animais de alto valor
85 por tempo indeterminado, maximizando assim o poder reprodutivo do macho e
86 permitindo seu uso mesmo após a morte do animal. Além disso, reduz os custos com
87 criação de reprodutores, tendo em vista que se pode adquirir sêmen congelado com
88 qualidade comprovada (Castelo *et al.*, 2008).

89 Através da criopreservação de sêmen e de embriões, será possível no futuro,
90 resgatar populações que, por algum motivo, possam ter se extinguido e que tenham
91 importantes características para a pecuária nacional. Nestas coleções, poderá se buscar a
92 variabilidade necessária e características de adaptabilidade às intempéries da natureza que
93 visem aumentar a produção ou acrescentar genes de interesse econômico às raças
94 comerciais (Hiemstra *et al.*, 2005).

95 Nessa concepção são reconhecidos pelo menos cinco ecotipos crioulos no país:
96 Canindé, Gurguéia, Marota, Moxotó e Repartida. Destes, apenas o Canindé e o Moxotó
97 são reconhecidos como raças. Estes animais, naturalizados no Nordeste brasileiro,
98 desenvolveram características adaptativas importantes (Brito *et al.*, 2008).

99 Dessa forma, é de extrema importância a avaliação da qualidade do sêmen de
100 caprinos nos aspectos físico e morfológico, que permitam a utilização segura em
101 programas de inseminação artificial e nas demais biotécnicas reprodutivas, assim como
102 para criopreservação, mantendo um banco de germoplasma de raças localmente
103 adaptadas de grande interesse biológico, produtivo e cultural.

104 Este valioso material genético poderá vir a ser utilizado para restabelecer uma
105 raça em processo de extinção, desenvolver um novo grupamento genético, dar suporte a

106 programas de conservação *in vivo* e fornecer material para estudos moleculares visando
107 à identificação de genes de importância econômica (Ramos *et al.*, 2009).

108 Portanto esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da época do ano sobre
109 as características físicas e morfológicas do sêmen caprino criopreservado, visando à
110 conservação do material genético de raças localmente adaptadas.

111

112 MATERIAL E MÉTODOS

113

114 **Ética em experimentação animal**

115 Todos os procedimentos realizados com os animais estavam em conformidade
116 com a legislação europeia para experimentação animal (Diretiva 2010/63/UE) e com a
117 legislação brasileira em pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008). O
118 procedimento descrito neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
119 Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o protocolo de N° 139/16.

120

121 **Local do experimento e grupos experimentais**

122 As atividades de coleta a campo foram realizadas na Fazenda Faveira localizada
123 no Km 138 da BR 316, a 20 km do município de Elesbão Veloso – PI, situado a
124 06°12'07'' de latitude sul e 42°08'25'' de longitude oeste. O clima é do tipo tropical
125 semiárido quente com temperaturas entre 25°C a 36°C e precipitação pluviométrica
126 média anual de 1171,5 mm (Fundação Cepro, 2001). O local caracteriza-se pela criação
127 de Caprinos e Ovinos de raças exóticas e de raças localmente adaptadas, assim como
128 bovinos. O período experimental correspondeu aos meses de março a maio de 2016 e de
129 setembro a novembro de 2016.

130 Foram utilizados 18 reprodutores caprinos adultos, das raças Azul, Canindé e
131 Moxotó, sendo seis animais de cada raça, com idade entre 2 e 5 anos de idade. Todos os
132 animais foram submetidos ao mesmo regime de manejo, sendo a alimentação a base de
133 forragem livre a pasto, água e sal mineral próprio para caprinos à vontade, além de
134 suplementação com ração concentrada. Previamente à realização das coletas de material
135 para análise os animais foram vermifugados, vacinados e submetidos a avaliação clínica
136 geral e andrológica.

137

138

139 **Parâmetros ambientais**

140 O monitoramento da temperatura e umidade relativa do ar foi realizado por meio
141 de termômetros de máxima e mínima (Incoterm, Brasil), bulbo seco e bulbo úmido
142 (Incoterm, Brasil) e de globo negro, colocados no centro do aprisco. As leituras dos
143 termômetros foram realizadas duas vezes nos dias da coleta (8 e 12 horas), durante o
144 período experimental. As temperaturas foram, posteriormente, convertidas em Índice de
145 Temperatura de Globo e Umidade (ITGU), conforme proposto por Buffington *et al.*
146 (1981), em que $ITGU = 0,72 (T_{bu} + T_{gn}) + 40,6$ (em que: T_{bu} = temperatura de bulbo
147 úmido, em °C; T_{gn} = temperatura de globo negro, em °C).

148

149 **Coleta e avaliação imediata do sêmen**

150 Todas as coletas de sêmen foram feitas no mesmo horário (turno da manhã), pelo
151 método da vagina artificial, com auxílio de fêmea estrogenizada (E.C.P®, Cipionato de
152 estradiol, Pfizer), entre os meses de março e maio (período chuvoso) e entre setembro e
153 novembro (período seco). Um *pool* dos ejaculados foram formados para análise e
154 verificados quanto ao aspecto e volume. Uma alíquota de cada amostra foi retirada para
155 avaliação dos parâmetros seminais físicos incluindo turbilhonamento, motilidade total,
156 assim como o vigor espermático, imediatamente após a coleta. Outra alíquota (10 µL) foi
157 colocada em 4 mL de formol salino a 4% (diluição 1:400), para mensurar a concentração
158 e a morfologia espermática (Cbra, 2013).

159 O volume (mL) foi medido com o auxílio de uma pipeta não fixa (100 - 1000 µL).
160 O turbilhonamento foi avaliado através de microscópio óptico (Opton TIM-107), com
161 aumento de 100 vezes, em uma gota de sêmen colocada sobre lâmina previamente
162 aquecida, sendo atribuído nota de zero a cinco (Cbra, 2013). A motilidade total, assim
163 como o vigor foram mensurados pela análise de uma gota de sêmen, diluída em Ringer
164 com lactato previamente aquecido a 37°C, em microscópio óptico (Opton TIM-107) com
165 aumento de 400 vezes, sendo o resultado da motilidade expressa em porcentagem e ao
166 vigor foi atribuída nota de zero a cinco.

167 A concentração (número de espermatozoides por mL) foi avaliada pelo método
168 da câmara de Neubauer, na concentração de 1:400, em solução de citrato de sódio em
169 formol a 4 %. As características morfológicas foram analisadas no Laboratório de
170 Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí (LBRA/UFPI),

171 pela técnica da preparação úmida, utilizando microscópio de contraste de fase (Olympus
172 optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000 vezes, contando 200 células
173 espermáticas por lâmina e classificando quanto a defeitos de cabeça, peça intermediária,
174 cauda, defeitos maiores e defeitos totais.

175

176 **Diluição e congelação do Sêmen**

177 No preparo do diluidor seminal foi utilizado o TRIS-frutose-ácido cítrico na
178 seguinte composição: 3,605g de TRIS (hidroximetil) aminometano; 2,024g de ácido
179 cítrico; 1,488g de frutose, 25mg de Gentamicina, 100mL de água destilada, 20% de gema
180 de ovo e 5% de glicerol. A diluição foi realizada com base na concentração espermática,
181 de modo a obter-se 20×10^6 espermatozoides/palheta. O acondicionamento foi feito em
182 palhetas de 0,25 mL e o processo de congelação em máquina TK 3000[®] (TK Tecnologia
183 em congelação Ltda, Uberaba, Brasil), em curva lenta de congelação específica para
184 sêmen caprino (-0,25°C/min, de 25°C a 5°C e -10°C/min, de 5°C a -120°C) e, após atingir
185 -120°C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas
186 em botijão criogênico. O tempo de equilíbrio na temperatura de 5°C foi de 30 minutos.
187 Após 30 dias de armazenamento, as amostras de sêmen foram descongeladas no
188 LBRA/UFPI, em banho-maria a 37°C por 30 segundos, e avaliadas quanto à integridade
189 e funcionalidade da membrana plasmática, integridade do acrossoma, função
190 mitocondrial e tempo de termorresistência lento (TTR).

191

192 **Testes de avaliação física, morfológica e estrutural dos espermatozoides e sêmen**

193 Imediatamente após a descongelação, cada amostra foi acondicionada em
194 microtubos em banho maria a 37°C. Uma alíquota de 10 µL foi retirada de cada amostra
195 para avaliação de motilidade e vigor espermáticos a cada 60 minutos, até o tempo de 180
196 minutos pós descongelação (0, 60, 120 e 180 minutos).

197 Foi avaliada a integridade da membrana espermática com o uso de sondas
198 fluorescentes, conforme descrito por Harrison e Vickers (1990), onde alíquotas de 50 µL
199 de sêmen, descongeladas a 37°C por 30 segundos e acondicionados em microtubos,
200 foram diluídas em 150 µL de TRIS (3,605 g de Tris (hidroximetil) aminometano; 2,024
201 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 100 mL de água destilada) contendo 5 µL de
202 Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) (0,46

203 mg/mL em DMSO) e 20 μ L de Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO,
204 USA) (0,5 mg/mL em PBS), e incubadas por 10 minutos a 37°C para posterior avaliação.
205 A análise se deu pela contagem de 100 espermatozoides em microscópio de
206 epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) em aumento de 1000 vezes,
207 sob óleo de imersão usando filtro de emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP
208 485/20nm. As células que apresentaram fluorescência verde foram consideradas íntegras,
209 enquanto aquelas apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.

210 Para o teste de funcionalidade da membrana, uma proporção de 10 μ L de sêmen
211 descongelado foi misturado a 1mL da solução hiposmótica constituída por citrato tri-
212 sódico e frutose, obedecendo a uma concentração de 150 mOsm/L, conforme Fonseca *et*
213 *al.* (2005) e incubados em Banho-Maria a 37°C, durante 60 minutos. Posteriormente,
214 10 μ L desta suspensão foi inserido sobre lâmina, coberta com lamínula, e observada em
215 microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com
216 aumento de 1000x. O resultado foi expresso em percentual pela diferença de caudas
217 dobradas antes e após o teste, em 200 espermatozoides contados.

218 A atividade mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
219 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Para tanto, alíquotas de 50 μ L de sêmen
220 pós-descongelado foram diluídas em 150 μ L de Tris contendo 5 μ L de JC-1 (0,15mM em
221 DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado
222 em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com
223 aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-
224 490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto
225 potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram
226 classificadas com baixo potencial de membrana.

227 Para análise da integridade acrossomal foi utilizado o isocianato de fluoresceína
228 conjugado (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), de acordo com a técnica
229 descrita por Roth *et al.* (1998), em que uma alíquota de 20 μ L da solução estoque de FITC-
230 PNA (1mg/mL) foi descongelada e adicionada a 480 μ L de solução de fosfato tamponada
231 (PBS) para obter a concentração final de 100 μ g/mL. Alíquotas de 20 μ L dessa solução
232 foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram
233 incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Após incubação,
234 as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para

235 secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μ L de meio de
236 montagem UCD (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de pphenylenediamine, 5mg
237 azida sódica) foi colocado sobre lâmina e coberta com lamínula. Foram avaliados 200
238 espermatozoides, em aumento de 1000x sob óleo de imersão, usando microscopia de
239 epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com filtro de emissão LP
240 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células espermáticas foram classificadas
241 como portadoras de acrossomas intactos (AI), quando a região acrossomal apresentou
242 fluorescência verde intensa. Foram considerados acrossoma reagido (AR) quando as
243 células espermáticas não apresentaram coloração verde ou a fluorescência verde se
244 restringiu apenas à região equatorial da cabeça espermática.

245

246 **Avaliação pelo sistema CASA**

247 A análise computadorizada do sêmen descongelado foi realizada no Núcleo
248 Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (NIB/UECE), através do
249 sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analyses), utilizando o software Sperm Class
250 Analyzer® (SCA) (Microoptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). Uma amostra de
251 10 μ L de sêmen descongelado de cada ejaculado foi diluído em 50 μ L de meio TRIS
252 (3,605 g de Tris (hidroximetil) aminometano; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose;
253 100 mL de água destilada) previamente aquecido em banho-maria a 37°C, e uma alíquota
254 de 10 μ L dessa diluição foi inserido em lâmina previamente aquecida a 37°C e analisado
255 com auxílio de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada
256 ao sistema (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão). Para cada amostra foram analisados
257 cinco campos. Dentre os parâmetros avaliados estão: motilidade progressiva (MP - %),
258 velocidade curvilinear (VCL - μ m/s), velocidade em linha reta (VSL - μ m/s), velocidade
259 média do percurso (VAP - μ m/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), índice
260 de oscilação ou wobble (WOB - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μ m) e
261 frequência de batimento cruzado (BCF - Hz), individual para cada espermatozoide
262 analisado.

263

264 **Análise estatística**

265 Para análise estatística dos dados, foram obtidas as médias e desvio-padrão, e
266 procedida à análise de variância dos parâmetros avaliados nas estações seca e chuvosa.

267 Para a comparação das médias foi realizado o teste de Duncan, de acordo com o
 268 coeficiente de variação obtido, considerando um nível de significância de 5%. Foi
 269 utilizado o PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis
 270 System) for Windows versão 9.0.

271

272

273

RESULTADOS E DISCUSSÃO

274 Foram registradas temperaturas médias de $31,80 \pm 0,25^\circ\text{C}$ durante a estação
 275 chuvosa (EC) e $33,93 \pm 1,39^\circ\text{C}$ durante a estação seca (ES) do ano. As médias de umidade
 276 relativa e precipitação pluviométrica na EC foram de $58,5 \pm 7,42\%$ e $85,03\text{mm/mês}$,
 277 respectivamente e na ES foram de $48,5 \pm 4,91\%$ e $33,9\text{mm/mês}$, respectivamente. O ITGU
 278 durante as épocas chuvosa e seca foram de 81,7 e 81,9, respectivamente.

279 De acordo com o National Weather Service - EUA, citado por Baêta (1985) os
 280 valores de ITGU até 74, proporcionam uma situação de conforto térmico; de 74 a 78, uma
 281 situação de alerta; de 79 a 84, situação perigosa e acima de 84, a situação é de emergência
 282 para ruminantes. Portanto, em ambos os períodos (seco e chuvoso), os animais estavam
 283 fora da zona de conforto térmico. O estresse pelo calor influencia diretamente na função
 284 reprodutiva do macho (Silva *et al.*, 2005) e na qualidade do sêmen (Barkawi *et al.*, 2006).

285 A média das dimensões testiculares dos reprodutores, analisados previamente ao
 286 início das coletas de sêmen, estão presentes na Tab. 1. Não houve diferença ($P > 0,05$)
 287 entre os grupos raciais avaliados quanto aos parâmetros estabelecidos no exame escroto-
 288 testicular. A raça Azul apresentou médias de dimensões testiculares numericamente
 289 maiores às raças Canindé e Moxotó.

290

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão das dimensões testiculares de reprodutores caprinos Azul, Canindé e Moxotó, Elesbão Veloso-PI, 2016

| Raças/Parâmetros | CE (cm) | ConsED (1-5) | ConsEE (1-5) | ConsTD (1-5) | ConstE (1-5) | CompTD (cm) | CompTE (cm) | LargTD (cm) | LargTE (cm) |
|------------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Azul | 26,20 | 3,33 | 3,33 | 3 | 3 | 7,16 | 7,03 | 4,73 | 4,76 |
| Canindé | 24,25 | 3,50 | 3,50 | 3 | 3 | 6,92 | 7,07 | 4,27 | 4,45 |
| Moxotó | 24,37 | 3,25 | 3,25 | 3 | 3 | 6,92 | 6,80 | 4,47 | 4,42 |

CE: Circunferência escrotal; ConsED: Consistência do epidídimo direito; ConsEE: Consistência do epidídimo esquerdo; ConsTD: Consistência do testículo direito; ConstE: Consistência do testículo esquerdo; CompTD: Comprimento do testículo direito; CompTE: Comprimento do testículo esquerdo; LargTD: Largura do testículo direito; LargTE: Largura do testículo esquerdo.

291

292 As correlações genéticas registradas por Dias *et al.* (2008) entre circunferência
 293 escrotal (CE) e defeitos espermáticos menores e defeitos totais foram de -0,67 e -0,12,

294 respectivamente, resultado que indica associação favorável entre o desenvolvimento
295 testicular e as características morfológicas desejáveis do sêmen e que a seleção de
296 reprodutores baseada no CE leva à seleção indireta favorável das características seminais.
297 Esse fato se confirma ao se observar a menor média de defeitos maiores e totais na raça
298 Azul (Tab. 3).

299 Souza (2010) verificou correlação moderada e positiva ($r>0,40$) entre o volume
300 do ejaculado e CE. No presente estudo, porém, a raça Moxotó apresentou maior volume
301 seminal médio que a raça Azul, mesmo com menor CE. Todavia, é preciso considerar que
302 o volume do ejaculado de um indivíduo pode apresentar variações devido a vários fatores,
303 como por exemplo, a ocorrência de ejaculações imediatamente antes da coleta para
304 avaliação, o tempo de excitação, o método de coleta, dentre outros (Souza, 2010; Cbra,
305 2013).

306 Os parâmetros físicos do sêmen das raças avaliadas nas estações chuvosa e seca
307 são mostradas na Tab. 2. Não houve interação entre os fatores estação do ano e grupos
308 raciais entre todos os parâmetros avaliados. Contudo observou-se diferença significativa
309 ($P<0,05$) entre as raças para a variável volume seminal. A raça Moxotó apresentou maior
310 volume de sêmen (0,65mL) em relação às demais raças dentre os dois períodos
311 analisados. A raça Azul não apresentou um volume mínimo de sêmen preconizado pelo
312 intervalo estabelecido pelo Cbra (2013), que varia entre 0,5 a 1,5 mL.

313 Não houve diferença entre as raças Azul e Canindé quanto à característica volume
314 seminal. Entretanto a raça Canindé apresentou concentração espermática numericamente
315 mais expressiva que as demais raças, o que pode ser uma peculiaridade nesse grupo racial,
316 maior concentração espermática em menor volume seminal.

317 Os grupos Canindé e Moxotó tiveram média de vigor espermático superior ao
318 grupo Azul, entre os períodos avaliados (chuvoso e seco) ($P<0,05$) (Tab. 2). Nenhuma
319 das raças avaliadas apresentou vigor espermático de acordo com o mínimo estabelecido
320 pelo Cbra (2013), ou seja, vigor maior ou igual a 4, em ambas as estações. Esse evento
321 pode reduzir significativamente os índices de fertilidade do sêmen, uma vez que os
322 espermatozoides chegam em menor proporção ao sítio de fecundação durante o período
323 de viabilidade oocitária.

324 Os valores de motilidade e vigor espermático do sêmen fresco foram inferiores
325 aos observados por Silva *et al.* (2005), avaliando as características físicas do sêmen

326 durante o período seco (94% e 4,4, respectivamente), porém verificou média de
 327 concentração espermática inferiores aos observados nesse estudo ($2,88 \times 10^9$ spz/mL), no
 328 mesmo período (ES). Os valores médios de turbilhonamento entre as raças mostram um
 329 valor numericamente reduzido na raça Azul (2,34) em relação as demais (2,77 e 2,55),
 330 que pode ser em parte explicado pelo vigor significativamente menor nesse grupo racial.
 331 O turbilhonamento é resultante da interação entre a motilidade, vigor e concentração
 332 espermática (Salviano e Souza, 2008). Amostras com turbilhonamento abaixo de 3 podem
 333 comprometer os resultados da inseminação em pequenos ruminantes (Neves *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros físicos (volume, turbilhão, motilidade, vigor) e concentração espermática do sêmen de caprinos Azul (AZ), Canindê (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso - PI, 2016

| Parâmetros | Estação (Período) | Raças (Reprodutores) | | | Média |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------|
| | | AZ | CD | MX | |
| Volume (mL) | EC | 0,52±0,2 | 0,44 ±0,1 | 0,65±0,1 | 0,53 |
| | ES | 0,53±0,1 | 0,37±0,1 | 0,74±0,5 | 0,55 |
| Média | | 0,52 ^{ab} | 0,40 ^a | 0,69 ^b | |
| Turbilhão (0-5) | EC | 2,0±1,2 | 2,55±0,8 | 2,43±1,3 | 2,32 |
| | ES | 2,76±0,8 | 3,0±0,6 | 2,7±0,7 | 2,81 |
| Média | | 2,34 | 2,77 | 2,55 | |
| Motilidade (%) | EC | 75,8±10,2 | 79,1±3,7 | 70,8±11,1 | 75,27 |
| | ES | 66,0±15,1 | 78,3±2,6 | 76,6±10,3 | 74,11 |
| Média | | 71,36 | 78,75 | 73,75 | |
| Vigor (0-5) | EC | 2,5±0,5 | 3,0±0,0 | 2,8±0,4 | 2,77 |
| | ES | 2,5±0,5 | 2,9±0,5 | 3,2±0,4 | 2,91 |
| Média | | 2,5 ^a | 2,95 ^b | 3,04 ^b | |
| Concentração ($\times 10^9$ spz/mL) | EC | 3,77±1,79 | 3,98±1,37 | 4,42±1,50 | 4,05 |
| | ES | 2,72±0,94 | 4,48±0,83 | 3,90±1,37 | 3,70 |
| Média | | 3,25 | 4,23 | 4,16 | |

Médias com letras diferentes na mesma linha denotam diferenças pelo teste de Duncan a 5% ($P < 0,05$). EC: estação chuvosa; ES: estação seca.

334

335 Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os parâmetros de volume, turbilhonamento,
 336 motilidade, vigor e concentração espermática entre as estações seca e chuvosa.
 337 Corroborando com os resultados desse estudo, Dantas *et al.* (2011) não verificaram
 338 efeitos estacionais sobre as características físicas do ejaculado. Vieira *et al.* (2008),
 339 avaliando a qualidade do sêmen de caprinos SPRD criados no estado do Piauí nos
 340 períodos seco e chuvoso, observaram diferenças significativas entre todos os parâmetros
 341 seminais físicos, em determinados grupos de caprinos, de acordo com o grau de bipartição
 342 escrotal, entre as estações, havendo valores de volume, turbilhonamento, motilidade,
 343 vigor e concentração espermática superiores no período chuvoso. As médias de

344 motilidade estão dentro dos padrões estabelecidos pelo Cbra (2013) (70-90% e $2-5 \times 10^9$
345 sptz/mL, para motilidade total e concentração espermática, respectivamente).

346 A baixa diferença de temperatura média entre os períodos seco e chuvosa
347 observados nesse estudo podem explicar as pequenas diferenças entre os parâmetros
348 físicos do sêmen fresco nesses grupos raciais. Santos e Simplício (2000) observaram que
349 o aumento acentuado da temperatura ambiente ligada ao aumento da temperatura
350 testicular, leva a uma acentuada redução nos parâmetros seminais de caprinos,
351 independente do genótipo.

352 Os parâmetros morfológicos de defeitos espermáticos são mostrados na Tab. 3.
353 Não houve interação entre os fatores estação do ano e raças em nenhuma das classes de
354 defeitos avaliados ($P > 0,05$). Todavia existiu diferença significativa entre as estações seca
355 e chuvosa nos defeitos de cabeça e nos defeitos maiores.

356 Durante a estação seca do ano, as amostras de sêmen apresentaram maior
357 proporção de espermatozoides com defeitos de cabeça ($P < 0,05$) em relação à estação
358 chuvosa (Tab. 3). Esse resultado corrobora com os encontrados por Vieira *et al.* (2008),
359 observando maior percentagem de defeitos de cabeça durante o período seco. As
360 modificações na cabeça espermática estão associadas a alterações transitórias ou
361 permanentes na espermiogênese, decorrentes de lesões traumáticas testiculares, estresse
362 calórico, febre, origem genética, fatores nutricionais, dentre outros (Chenoweth, 2005).

363 Todavia, no presente estudo, foi no período chuvoso que existiu maior
364 percentagem de defeitos maiores (10,2%), que podem prejudicar a fertilidade do sêmen,
365 ultrapassando o limite pré-fixado pelo Cbra (2013) de 10%. Portanto a maior parte dos
366 defeitos espermáticos maiores que contribuem para redução dos índices de fertilidade na
367 estação chuvosa não são defeitos de cabeça, mas provavelmente estão inseridos dentro da
368 categoria de defeitos de cauda, que geralmente ocorrem durante a maturação espermática,
369 no trânsito pelo epidídimo, onde as caudas se dobram depois de formadas, por alguma
370 alteração, como o choque osmótico (Arruda *et al.* 2015).

371 Dantas *et al.* (2011) não observaram diferenças na percentagem de células
372 espermáticas com defeitos maiores entre as estações seca e chuvosa, no sêmen de caprinos
373 Saanen, mostrando que o período do ano não influenciou o aparecimento dessa patologia.
374 Não houve diferença entre os grupos raciais para os parâmetros morfológicos de defeitos
375 espermáticos avaliados ($P > 0,05$).

376 Vidigal (2008), estudando a morfologia espermática em caprinos SPRD observou
 377 maiores percentagens de defeitos de cabeça (1,27%), comparados às raças Azul e Canindé
 378 e menor quando comparado à raça Moxotó, desse estudo, assim como média de defeitos
 379 de peça intermediária (0,91%) superior aos encontrados em todas as raças do presente
 380 estudo. Todas as alterações da peça intermediária interferem na produção de energia, ou
 381 seja, na produção de ATP, necessário para que ocorra o batimento flagelar. Portanto, esta
 382 alteração está diretamente relacionada com a motilidade espermática (Celeghini *et al.*,
 383 2007).

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros morfológicos (defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeitos de cauda, defeitos maiores e defeitos totais) de espermatozoides caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso-PI, 2016

| Parâmetros | Estação (Período) | Raças (Reprodutores) | | | Média |
|---|-------------------|----------------------|------------|-------------|--------------------|
| | | AZ | CD | MX | |
| Defeitos de cabeça (%) | EC | 0,30±0,44 | 0,10±0,22 | 1,10±1,38 | 0,50 ^a |
| | ES | 1,30±1,44 | 2,08±2,17 | 1,75±1,78 | 1,73 ^b |
| Média | | 0,80 | 1,18 | 1,45 | |
| Defeitos de peça intermediária (%) | EC | 0,0±0,0 | 0,10±0,22 | 0,40±0,65 | 0,16 |
| | ES | 0,20±0,27 | 0,0±0,0 | 0,08±0,20 | 0,09 |
| Média | | 0,10 | 0,04 | 0,22 | |
| Defeitos de cauda (%) | EC | 13,70±7,47 | 17,50±8,38 | 15,00±12,85 | 15,40 |
| | ES | 12,30±4,86 | 22,50±5,70 | 9,83±9,69 | 18,55 |
| Média | | 13,00 | 20,22 | 17,63 | |
| Defeitos maiores (%) | EC | 6,20±2,30 | 11,60±7,24 | 12,80±12,92 | 10,20 ^a |
| | ES | 5,40±2,55 | 3,00±1,04 | 7,00±5,98 | 5,11 ^b |
| Média | | 5,80 | 6,90 | 9,63 | |
| Defeitos totais (%) | EC | 14,0±7,90 | 17,70±8,25 | 16,50±12,71 | 16,06 |
| | ES | 13,80±4,28 | 24,58±7,39 | 21,66±9,06 | 20,38 |
| Média | | 13,90 | 21,45 | 19,31 | |

Médias com letras diferentes na coluna denotam diferenças pelo teste de Duncan a 5% ($P < 0,05$). EC: estação chuvosa; ES: estação seca.

384
 385 A raça Canindé apresentou proporção de defeitos espermáticos totais (21,45%)
 386 acima do limite máximo estabelecido pelo Cbra (2013), ou seja, menor ou igual a 20%.
 387 Isso se deve à grande proporção de defeitos totais encontrados durante a estação seca do
 388 ano. No período seco também houve elevada proporção de defeitos espermáticos totais
 389 na raça Moxotó (21,66%). Os espermatozoides mortos e anormais apresentam efeitos
 390 adversos sobre a fertilidade potencial do sêmen (Maxwell e Watson, 1996).

391 Segundo Rege *et al.* (2000), o total de espermatozoides normais é a melhor forma
 392 de se avaliar o efeito da época do ano na viabilidade espermática, uma vez que está
 393 correlacionado com o teste de fertilidade. Não foi ultrapassado o limite de

394 espermatozoides com defeitos maiores segundo o Cbra (2013) (10%), em nenhum dos
395 grupamentos raciais avaliados.

396 Na avaliação da longevidade espermática pelo teste de termorresistência lento
397 (TTR), não houve interação entre os fatores estação do ano, grupos raciais e tempos de
398 avaliação dos parâmetros de motilidade total e vigor espermático ($P>0,05$). Na Tab. 4,
399 observa-se diferença significativa entre as estações seca e chuvosa nos parâmetros
400 motilidade e vigor ($P<0,05$). Tanto a motilidade total quanto o vigor espermático foram
401 superiores na estação chuvosa (25,97% e 2,43, respectivamente). Vijayaraghavan *et al.*
402 (2003) colocam a motilidade como o mais importante indicador *in vitro* da capacidade de
403 fertilização do espermatozoide. Dessa forma, o sêmen congelado durante o período
404 chuvoso pode apresentar maiores índices de fertilidade.

Tabela 4 – Motilidade total e vigor de espermatozoides caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX), em diferentes tempos pós-descongelamento (0, 60, 120 e 180 minutos), pelo teste de termorresistência (TTR), nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso – PI, 2016

| Parâmetros | Tempo (Minutos) | Estação (Período) | Raças (Reprodutores) | | | Média | |
|----------------------|-----------------|-------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | AZ | CD | MX | T | E |
| Motilidade total (%) | 0 | EC | 35,83±11,58 | 41,66±16,33 | 35,83±17,72 | T0 | 25,97 ^a |
| | 60 | EC | 28,33±14,02 | 37,50±18,64 | 28,33±14,72 | 33,57 ^a | |
| | 120 | EC | 21,66±14,02 | 28,00±15,36 | 20,00±14,14 | T60 | |
| | 180 | EC | 8,33±8,01 | 15,83±13,99 | 10,33±8,16 | 27,57 ^a | |
| | 0 | ES | 19,00±8,94 | 35,83±8,01 | 30,83±16,25 | T120 | 20,89 ^b |
| | 60 | ES | 15,00±10,00 | 29,16±8,01 | 25,00±17,32 | 20,23 ^b | |
| | 120 | ES | 12,00±11,51 | 15,83±7,35 | 22,50±10,36 | T180 | |
| | 180 | ES | 3,60±2,19 | 17,50±9,35 | 18,83±11,23 | 12,65 ^c | |
| Média | | | 18,47 ^a | 27,66 ^b | 23,96 ^b | | |
| Vigor (0-5) | 0 | EC | 3,16±0,40 | 3,33±0,51 | 3,16±0,40 | T0 | 2,43 ^a |
| | 60 | EC | 2,66±0,51 | 2,83±0,40 | 3,00±0,63 | 3,05 ^a | |
| | 120 | EC | 1,83±0,75 | 2,33±0,81 | 1,83±0,98 | T60 | |
| | 180 | EC | 1,33±0,81 | 2,16±0,75 | 1,50±0,83 | 2,57 ^b | |
| | 0 | ES | 2,80±0,44 | 2,83±0,75 | 3,00±0,63 | T120 | 2,13 ^b |
| | 60 | ES | 1,80±1,09 | 2,66±0,51 | 2,33±0,51 | 1,94 ^c | |
| | 120 | ES | 1,40±0,89 | 2,00±0,63 | 2,16±0,40 | T180 | |
| | 180 | ES | 0,80±0,44 | 1,83±0,40 | 1,66±0,51 | 1,57 ^d | |
| Média | | | 2,00 ^a | 2,50 ^b | 2,33 ^b | | |

Médias de motilidade com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% ($P>0,05$). Médias de vigor com mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% ($P>0,05$).

405

406 Ao comparar os parâmetros de motilidade e vigor espermático antes e após a
407 criopreservação (Tab. 2 e 4), verifica-se que anteriormente à congelação não havia
408 diferença entre esses parâmetros durante as estações seca e chuvosa, e que após o
409 processo de criopreservação, a motilidade e vigor espermático apresentou melhores
410 resultados durante a estação chuvosa. Portanto, o fator congelabilidade do sêmen pode
411 ser mais favorável durante o período chuvoso. Um dos fatores que podem estar

412 contribuindo para esse evento são as prováveis variações na concentração de proteínas
413 plasmáticas de baixo peso molecular, entre as estações do ano, pois essas proteínas
414 protegem quanto aos danos ocasionados pela peroxidação lipídica da membrana
415 plasmática, na ativação da motilidade e na capacitação espermática (La Falci *et al.*, 2002)

416 Na média dos grupos raciais, a motilidade e vigor espermático pós-descongelação
417 estão dentro dos valores preconizados pelo Cbra (2013).

418 As raças que apresentaram maiores médias de motilidade espermática e vigor no
419 sêmen fresco (Canindé – 78,75%/2,95 e Moxotó – 73,75%/3,04) também tiveram maior
420 motilidade e vigor espermático após a descongelação (Canindé – 27,66%/2,5 e Moxotó –
421 23,96%/2,33). Isso também foi observado por Santos *et al.* (2006), utilizando o TTR para
422 avaliação do congelamento do sêmen caprino.

423 Avaliando o efeito dos tempos de incubação sobre os parâmetros de motilidade e
424 vigor espermáticos, observa-se que até 60 minutos pós-descongelação a motilidade
425 espermática se manteve a um nível semelhante ao momento da descongelação (tempo 0),
426 porém a partir de 120 minutos houve uma redução significativa nesse parâmetro. Em
427 relação ao vigor espermático observa-se redução significativa a cada hora durante o teste
428 de termorresistência ($P < 0,05$).

429 Verificando o comportamento dos grupamentos raciais avaliados sobre essas
430 variáveis, observa-se que as raças Canindé e Moxotó tiveram motilidade e vigor
431 espermáticos superiores aos observados na raça Azul, durante o TTR e em ambos os
432 períodos (seco e chuvoso), sugerindo menor longevidade espermática da raça Azul após
433 a descongelação, o que pode reduzir a proporção de espermatozoides presentes no local
434 de fertilização, quando da utilização do sêmen congelado em programas de inseminação
435 artificial.

436 Os resultados relativos à avaliação estrutural da célula espermática (integridade
437 de membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade acrossomal) e suas
438 variações em diferentes tempos pós-descongelação (0, 60, 120 e 180 minutos), estão
439 discriminados na Tab. 5.

440 Dessa forma, não houve diferença significativa entre as raças avaliadas nos
441 parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal ($P > 0,05$). Resultados
442 semelhantes foram encontrados por Vidigal (2008) (44,69% - 49,55%) ao comparar a taxa

443 de integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos SPRD com e sem
444 escroto bipartido.

445 As raças Canindé e Moxotó apresentaram maior percentual de células com
446 atividade mitocondrial em relação à raça Azul. Os resultados inferiores de motilidade
447 total avaliados durante o TTR na raça Azul (18,47%) podem ser explicados, em parte,
448 pela reduzida atividade mitocondrial nas células espermáticas nesse grupo.

Tabela 5 - Médias e desvios-padrão das características estruturais da célula espermática do sêmen congelado de caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso - PI, 2016

| Parâmetros | Tempo (Minutos) | Estação (Período) | Raças (Reprodutores) | | | Média | |
|--|-----------------|-------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-------------|--------------------|
| | | | AZ | CD | MX | T | E |
| Integridade de Membrana Plasmática (%) | 0 | EC | 54,16±24,50 | 54,83±22,00 | 57,00±24,71 | T0 | 57,38 |
| | 60 | EC | 56,83±18,84 | 59,16±21,32 | 60,66±25,91 | | |
| | 120 | EC | 58,33±26,92 | 61,50±28,44 | 59,83±24,43 | T60 | |
| | 180 | EC | 54,16±23,25 | 59,00±28,00 | 53,16±26,34 | | |
| | 0 | ES | 46,80±8,95 | 52,66±9,30 | 53,66±20,94 | T120 | 54,10 |
| | 60 | ES | 49,00±10,83 | 51,16±10,53 | 56,00±15,32 | | |
| | 120 | ES | 50,20±14,35 | 54,66±12,01 | 58,5±15,55 | T180 | |
| | 180 | ES | 57,20±16,45 | 56,00±20,13 | 61,16±14,93 | | |
| Média | | | 53,56 | 56,12 | 57,50 | | |
| Atividade Mitocondrial (%) | 0 | EC | 15,66±14,03 | 41,00±25,74 | 31,33±13,88 | T0 | 36,10 ^A |
| | 60 | EC | 23,00±20,37 | 55,66±17,58 | 45,50±11,34 | | |
| | 120 | EC | 19,83±16,75 | 50,66±22,34 | 42,66±6,40 | T60 | |
| | 180 | EC | 21,83±17,84 | 51,50±20,80 | 34,50±11,76 | | |
| | 0 | ES | 31,60±11,10 | 52,33±11,20 | 55,50±14,59 | T120 | 50,77 ^B |
| | 60 | ES | 36,60±13,83 | 55,00±7,79 | 55,00±9,52 | | |
| | 120 | ES | 42,00±21,96 | 61,50±9,60 | 56,00±18,06 | T180 | |
| | 180 | ES | 40,40±19,80 | 56,83±12,40 | 59,20±10,25 | | |
| Média | | | 28,07 ^a | 53,06 ^b | 47,21 ^b | | |
| Integridade de Acrossoma (%) | 0 | EC | 24,66±10,98 | 25,83±12,52 | 26,33±13,15 | T0 | 27,05 ^A |
| | 60 | EC | 27,16±12,49 | 24,16±12,79 | 21,66±11,99 | | |
| | 120 | EC | 28,33±6,47 | 29,66±10,11 | 24,50±11,25 | T60 | |
| | 180 | EC | 26,16±8,95 | 32,83±10,74 | 34,60±15,82 | | |
| | 0 | ES | 54,20±18,68 | 59,16±9,62 | 58,40±13,93 | T120 | 53,52 ^B |
| | 60 | ES | 47,00±1,00 | 58,66±13,32 | 52,00±6,72 | | |
| | 120 | ES | 55,80±7,75 | 51,50±13,18 | 58,50±12,62 | T180 | |
| | 180 | ES | 44,60±11,21 | 44,66±14,06 | 51,50±10,33 | | |
| Média | | | 37,41 | 41,44 | 40,70 | | |

Médias com letras diferentes minúsculas, na mesma linha, denotam diferenças pelo teste de Duncan a 5% (P<0,05). Médias com letras diferentes maiúsculas, nas colunas, denotam diferenças entre si no mesmo parâmetro (P<0,05) EC: estação chuvosa; ES: estação seca.

449

450 Cavalcante *et al.* (2005), avaliando o sêmen de caprinos, aplicando a mesma
451 metodologia na determinação da atividade mitocondrial, obtiveram índices superiores aos
452 encontrados neste trabalho, sendo de 66,00 e 67,25% para o sêmen descongelado, de
453 animais das raças Boer e Alpina, respectivamente.

454 As técnicas de avaliação da atividade mitocondrial têm sido utilizadas em
455 associação a biotécnicas reprodutivas como a criopreservação de sêmen, a qual determina
456 considerável redução da atividade mitocondrial e, conseqüentemente, da capacidade

457 fertilizante dos espermatozoides (Marco-Jiménez *et al.*, 2006). Hemachand e Shaha
458 (2003), trabalhando com espermatozoides caprinos obtidos do epidídimo ou do ejaculado,
459 submetidos a estresse oxidativo, relataram haver relação entre o padrão de coloração com
460 o JC-1 e a motilidade espermática.

461 Na Tab. 5 é possível observar que durante a estação seca do ano houve maior
462 proporção de células espermáticas no ejaculado com acrossoma íntegro e com atividade
463 mitocondrial ($P < 0,05$), o que pode reduzir a possibilidade de reação acrossômica precoce,
464 elevando os índices de fertilidade do sêmen. Vidigal (2008) encontrou médias de $44,69 \pm$
465 $20,55$ e $49,55 \pm 20,88$, para espermatozoides caprinos com acrossomo íntegro, para
466 animais sem e com escroto bipartido, respectivamente. Portanto, superiores aos
467 observados nas médias das raças em estudo, porém com valores inferiores aos observados
468 na estação seca (53,52%).

469 Nesse estudo, houve uma correlação negativa entre atividade mitocondrial e
470 motilidade espermática, visto que, durante o TTR, na estação seca, a percentagem de
471 espermatozoides móveis foi inferior ao período chuvoso.

472 Silva e Gadella (2006) relatam a existência de enzimas, envolvidas na glicólise,
473 na bainha fibrosa da cauda, que podem contribuir para a geração de energia para a célula
474 espermática. Entretanto, outros autores afirmam ser indispensável a produção de ATP
475 pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (Papaioannou *et al.*, 1997; Connell
476 *et al.*, 2002). Além disso esse resultado pode sugerir que outros mecanismos estão
477 interferindo na transmissão de energia na forma de ATP para a motilidade espermática,
478 durante esse período.

479 Não existiu diferença significativa entre as variáveis estruturais analisadas nos
480 diferentes tempos pós-descongelção, demonstrando que mesmo após 180 minutos de
481 descongelção não se observa interferência significativa sobre a qualidade estrutural da
482 célula espermática nos parâmetros avaliados (Tab. 5).

483 Não houve interação entre os fatores estação do ano, grupos raciais e tempos de
484 avaliação dos parâmetros estruturais da célula espermática ($P > 0,05$).

485 No tocante à funcionalidade de membrana plasmática dos espermatozoides
486 caprinos localmente adaptados, não houve diferença pelo HOST entre os grupos raciais
487 avaliados ($P > 0,05$) (Tab. 6). Por outro lado, observou-se diferença significativa na média
488 das raças nas estações do ano ($P < 0,05$). Na estação chuvosa ocorreu maior percentagem

489 de células com membrana funcional, uma característica importante de resistência ao
490 processo de criopreservação e de sobrevivência espermática pós-descongelamento.

491 Todos os grupos raciais apresentaram média de funcionalidade de membrana
492 espermática pós-descongelamento superior ao observado por Bittencourt *et al.* (2005), ao
493 utilizar o Glicerol como crioprotetor no diluidor seminal (16,9%), o mesmo utilizado
494 nesse estudo. No entanto, Oliveira *et al.* (2013) avaliando a eficácia do teste no sêmen
495 caprino, sob diferentes osmolaridades, encontrou taxas de espermatozoides reativos ao
496 teste, superior ao observado nesse estudo, utilizando a mesma solução hiposmótica
497 (33,25%).

Tabela 6 - Valores médios (%) e desvio padrão de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST), nas raças Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX), nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), Elesbão Veloso-PI, 2016

| Parâmetros | Estação (Período) | Raças (Reprodutores) | | | Média |
|------------|----------------------|----------------------|-------------|-------------|--------------------|
| | | AZ | CD | MX | |
| HOST (%) | EC | 26,66±11,62 | 34,16±13,74 | 25,66±12,84 | 28,83 ^a |
| | ES | 8,00±12,10 | 15,33±8,96 | 15,16±10,83 | 13,12 ^b |
| Média | | 18,18 | 24,75 | 20,41 | |

Médias com letras diferentes, na coluna, denotam diferenças pelo teste de Duncan a 5% ($P < 0,05$). EC: estação chuvosa; ES: estação seca.

498

499 As altas temperaturas do ambiente provavelmente influenciaram a qualidade
500 seminal, alterando o processo de maturação no epidídimo, comprometendo as estruturas
501 da membrana plasmática dos espermatozoides (Huang *et al.*, 2000), reduzindo o
502 percentual de caudas dobradas após a exposição ao meio hiposmótico.

503 Não houve interação entre os fatores estação do ano e grupos raciais pela avaliação
504 da funcionalidade de membrana plasmática pelo HOST ($P > 0,05$).

505 Durante o período em que os ejaculados apresentaram maior proporção de
506 espermatozoides com funcionalidade de membrana plasmática (chuvoso) houve também
507 maior motilidade e vigor espermático, como podem ser observados nas Tab. 4 e 6. O
508 estudo realizado por Oliveira *et al.* (2013), por sua vez, demonstrou baixa correlação entre
509 as características clássicas do sêmen com os resultados do HOST.

510 Outros autores encontraram vários níveis de correlação positiva entre essas
511 variáveis em diversas espécies: bovinos (Siqueira *et al.*, 2007), equino (Melo e Henry,
512 1999), cão (Bueno *et al.*, 2001) e búfalo (Zúccari *et al.*, 2009).

513 Os dados relativos à análise computadorizada da cinética espermática do sêmen
514 descongelado das raças avaliadas, pelo sistema CASA, encontram-se dispostos na Tab.
515 7.

516 Não houve interação entre os fatores estação do ano e raças dos reprodutores em
517 nenhum dos parâmetros avaliados pelo CASA, não havendo, portanto, diferença entre os
518 níveis desses fatores ($P>0,05$).

Tabela 7 – Cinética pós-descongelamento (Média±DP) de espermatozoides caprinos Azul (AZ), Canindé (CD) e Moxotó (MX) nas estações seca (ES) e chuvosa (EC), analisados pelo CASA, Elesbão Veloso-PI, 2016

| Parâmetros | Estação (Período) | Raças (Reprodutores) | | | Média |
|------------|-------------------|----------------------|-----------|-----------|-------------------|
| | | AZ | CD | MX | |
| MP (%) | EC | 14±9,3 | 18,3±8,7 | 12,6±8,8 | 14,9 |
| | ES | 8,2±6,9 | 13,8±7,6 | 10,2±9,6 | 10,9 |
| Média | | 11,38 | 16,10 | 11,46 | |
| MNP (%) | EC | 25,8±12,1 | 25,4±14,2 | 24,7±14,2 | 25,3 ^a |
| | ES | 10,3±13,3 | 21,7±9,1 | 10,7±5,9 | 14,5 ^b |
| Média | | 18,75 | 23,58 | 17,74 | |
| VCL (µm/s) | EC | 72,5±12,2 | 83±5,1 | 75,1±6,5 | 76,8 |
| | ES | 59,7±33,6 | 70,4±5,5 | 74,7±17,4 | 68,7 |
| Média | | 66,7 | 76,7 | 74,9 | |
| VSL (µm/s) | EC | 31,9±7,6 | 42,2±9,7 | 34,9±8,9 | 36,3 |
| | ES | 31,2±18,4 | 33,8±6,3 | 36,2±17,1 | 33,9 |
| Média | | 31,6 | 38 | 35,6 | |
| LIN (%) | EC | 43,6±4,6 | 50,8±10,5 | 46,2±9,9 | 46,9 |
| | ES | 41,7±24,5 | 47,9±7,6 | 49,2±18,7 | 46,6 |
| Média | | 42,8 | 49,4 | 47,7 | |
| BCF (Hz) | EC | 12,6±0,7 | 11,1±2,3 | 12,7±2,3 | 12,2 ^a |
| | ES | 8,3±5 | 11,6±1,1 | 8,7±4,6 | 9,6 ^b |
| Média | | 10,6 | 11,4 | 10,8 | |

Médias com letras diferentes, nas colunas, denotam diferenças entre si no mesmo parâmetro pelo teste de Duncan ($P<0,05$). EC: estação chuvosa; ES: estação seca; MP: motilidade progressiva; MNP: motilidade não progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; LIN: linearidade; BCF: frequência de batimentos de cauda.

519

520 Os valores observados na VSL e VAP estão abaixo dos encontrados por Oliveira
521 *et al.* (2011). Isso pode ter ocorrido em função dos danos ocasionados pelo processo de
522 criopreservação, devido a reduzida congelabilidade do sêmen, principalmente durante o
523 período seco. Verstegen *et al.* (2002) verificaram alta correlação positiva entre os valores
524 de VAP, VSL e VCL e altas taxas de fertilização de oócitos.

525 Os resultados referentes à motilidade progressiva pelo sistema CASA demonstram
526 valores médios abaixo dos observados por Oliveira *et al.* (2011), avaliando o sêmen pelo
527 sistema 5 minutos pós-descongelamento ($30,9±12,5%$), mas superiores aos encontrados por

528 Bezerra (2009), que encontrou uma média de $3,5\pm 0,4\%$, ambos utilizando o mesmo
529 diluidor seminal.

530 Durante a estação chuvosa ocorreu maior porcentagem de espermatozoides com
531 motilidade não progressiva no sêmen ($P<0,05$). Esse evento pode reduzir a progressão da
532 célula espermática através do trato reprodutivo da fêmea após monta natural ou
533 inseminação artificial (IA). Durante a estação chuvosa, o sêmen dos caprinos avaliados
534 apresentou maior frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) ($P<0,05$). Segundo
535 Verstegen *et al.* (2002), durante a hiperativação espermática, ocorre redução do batimento
536 flagelar cruzado, fato característico do processo de capacitação espermática.

537 Dessa forma, pressupõe-se que a maior frequência de batimentos de cauda durante
538 a estação chuvosa seja em decorrência de menores níveis de ativação espermática e menor
539 proporção de espermatozoides pré-capacitados, o que pode prevenir um processo de
540 reação acrossômica precoce. Amostras com elevados valores dos parâmetros de
541 velocidade, de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical
542 (Verstegen *et al.*, 2002).

543

544

CONCLUSÕES

545

546 A época do ano não exerceu efeito significativo sobre as características físicas e
547 morfológicas, conjuntamente, do sêmen caprino criopreservado de raças localmente
548 adaptadas, portanto a criopreservação espermática pode ser realizada durante qualquer
549 período do ano visando a conservação de recursos genéticos.

550

551

AGRADECIMENTOS

552

553 Agradecemos à equipe do Núcleo Integrado de Biotecnologia, da Universidade
554 Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil, pela assistência na análise seminal computadorizada
555 (CASA). Os autores gostariam de agradecer à Fazenda Faveira, Elesbão Veloso, Piauí,
556 pela disponibilidade em conceder os animais para pesquisa e ao Conselho Nacional de
557 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

558

559

560

REFERÊNCIAS

561

562

563 ARRUDA, R.B.; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R. *et al.* Morfologia espermática de
564 touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.39, n.1, p.47-
565 60, 2015.

566

567 BAÊTA, F.C. *Responses of lacting dairy cows to the combined effects of temperature,*
568 *humidity and wind velocity in the warm season.* 1985. 218f. Tese (Doutorado) -
569 University of Missouri, Missouri, 1985.

570

571 BARKAWI, A.H.; ELSAYED, E.H.; ASHOUR, G. *et al.* Seasonal changes in semen
572 characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Ruminant*
573 *Res.*, v.66, n.1-3, p.209-213, 2006.

574

575 BEZERRA, F.S.B. *Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas,*
576 *taxas de descongelamento e crioprotetores.* 98f. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência
577 Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.

578

579 BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SANTOS, A.D.F. *et al.* Utilização do
580 teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do
581 sêmen caprino. *Ci. Anim. Bras.*, v.6, n.3, p.213-218, 2005.

582

583 BRITO, R.L.L.; FARIAS, J.L.S.; SANTOS, D.O. *et al.* Avaliação do comportamento
584 reprodutivo de caprinos naturalizados como doadores de sêmen. In: CONGRESSO
585 NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2008, Aracajú, *Resumos...* Aracajú:
586 CNPA, 2008.

587

588 BUFFINGTON, D.E.; COLAZZO-AROCHO, A.; CANTON, G.H. *et al.* Black globe-
589 humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *T. ASAE*, v.24, p.711-714,
590 1981.

591

592 CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do
593 sêmen de caprinos. *Acta Vet. Bras.*, v.2, p.67-75, 2008.

594

595 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e*
596 *avaliação de sêmen animal.* 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

597

598 CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. *et al.* Practical techniques
599 for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and
600 mitochondrial membranes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, p.479-488, 2007.

601

602 CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, v.64, p.457-468, 2005.

603

604 CONNELL, M.O.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on
605 sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.*, v.17, p.704-709,
606 2002.

607

- 608 DANTAS, V.M.; SOUZA, M.I.L.; MONREAL, A.C.D. *et al.* Variações anuais nas
609 características seminais, perímetro escrotal e testosterona plasmática em bodes Saanen no
610 Mato Grosso do Sul, Brasil. *Vet. Zootec.*, v.5, n.1, p.9-19, 2011.
- 611
- 612 DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M. *et al.* Correlações genéticas e
613 fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesq.*
614 *Agropec. Bras.*, v.43, p.53-59, 2008.
- 615
- 616 EVANS, G.; MAXWELL, W.M.A. Salamon's artificial insemination of sheep of
617 goats. Sydney, *Butterworths*, p.194, 1987.
- 618
- 619 FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V. *et al.* The hypoosmotic swelling test
620 in fresh goat spermatozoa. *Anim. Reprod.*, v.2, p.139-144, 2005.
- 621
- 622 FUNDAÇÃO CEPRO. Anuário estatístico do Piauí, Teresina, 2001. Disponível em:
623 <http://www.cepro.pi.gov.br/download/201102/CEPRO25_b744851c89.pdf>. Acesso
624 em: 01 jul. 2015.
- 625
- 626 GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species
627 and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using
628 fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.*, v.84, p.2089-2100, 2006.
- 629
- 630 HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane
631 integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.88, p.343-352, 1990.
- 632
- 633 HEMACHAND, T.; SHAHA, C. Functional role of sperm surface glutathione
634 Stransferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative
635 stress. *FEBS Lett*, v.538, p.14-18, 2003.
- 636
- 637 HIEMSTRA, S.J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS H. The potential of
638 cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation
639 strategies. In: *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic*
640 *resources*. Rome: FAO, 2005. p.25-35.
- 641
- 642 HUANG, S.Y.; KUO, Y.H.; LEE, Y.P. *et al.* Association of heat shock protein 70 with
643 semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 63, p. 231-240, 2000.
- 644
- 645 KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal
646 variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goats bucks born raised in
647 Greece. *Theriogenology*, v.53, n.6, p.1285-1293, 2000.
- 648
- 649 LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES J.L. *et al.* Seasonal variation of
650 goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, v.57, p.1035-1048, 2002.
- 651
- 652 MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram
653 semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.55-65, 1996.
- 654

- 655 MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arq. Bras.*
656 *Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.71-78, 1999.
- 657
- 658 NEVES, J.P.; NUNES, J.F.; MORAIS, J.C.F. *et al.* Inseminação artificial em pequenos
659 ruminantes. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.F.; FREITAS, V.J.F. (eds.).
660 Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 77-97.
- 661
- 662 OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. *et al.* Avaliação de
663 espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-
664 101®) ou TRIS. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.6, n.6, p.1295-1302, 2011.
- 665
- 666 OLIVEIRA, I.R.S.; ALVES, H.M.; CASTELO, T.S. *et al.* Correlações entre o teste
667 hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ci. Anim. Bras.*, Goiânia, v.14,
668 n.2, p.216-221, 2013.
- 669
- 670 PAPAIOANNOU, K.Z.; MURPHY, R.P.; MONKS, R.S. *et al.* Assessment of viability
671 and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow
672 cytometry. *Theriogenology*, v.48, p.299-312, 1997.
- 673
- 674 RAMOS, A.F.; NASCIMENTO, N.V.; SILVA, A.V.R. *et al.* Qualidade do sêmen bovino
675 estocado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. In: SIMPOSIO
676 IBEROAMERICANO SOBRE CONSERVACIÓN E UTILIZACIÓN DE RECURSOS
677 ZOOGENÉTICOS, 10., 2009, Palmira. *Memórias...* Palmira: Universidad Nacional de
678 Colombia, 2009. p.499-502.
- 679
- 680 REGE, J.E.O.; TOE, F.; MUKASA-MUGERWA, E. *et al.* Reproductive characteristics
681 of Ethiopian highland sheep. Genetic parameters of semen characteristics and their
682 relationships with testicular measurements in Ram lambs. *Small Ruminant Res.*, v.37,
683 p.173-187, 2000.
- 684
- 685 ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L. Heterologous in vitro fertilization and sperm
686 capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx*
687 *dammah*). *Biol. Reprod.*, v.58, p.475-482, 1998.
- 688
- 689 SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen
690 caprino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.159-167, 2008.
- 691
- 692 SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em
693 caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.35,
694 n.9, p.1835-1841, 2000.
- 695
- 696 SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A; FONSECA, J.F. *et al.* Uso de testes
697 complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao
698 manejo de fotoperíodo artificial. *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.5, p.1934- 1942, 2006.
- 699
- 700 SAS. SAS Software. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 2002.
- 701

- 702 SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; PEÑA ALFARO, C.E. *et al.* Efeito das épocas do ano e de
703 turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semiárido paraibano.
704 ACSA, v.1, p.7-14, 2005.
- 705
706 SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells.
707 *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- 708
709 SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P. *et al.* Relação da taxa de gestação
710 com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. *R. Bras. Zootec.*,
711 v.36, p.387-395, 2007.
- 712
713 SOUZA, L.E.B. *Parâmetros andrológicos de caprinos da raça anglonubiana criados em*
714 *sistema semi-intensivo*. 2010. 41f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de
715 Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga,
716 2010.
- 717
718 VERSTEGEN J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen
719 analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-
720 179, 2002.
- 721
722 VIDIGAL, K.F. *Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e*
723 *mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal*. 2008. 77p.
724 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência
725 Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.
- 726
727 VIEIRA, R.J.; CARDOSO, F.T.S.; AZEVEDO, L.M. *et al.* Influência da morfologia
728 escrotal e da época do ano na qualidade do sêmen de caprinos criados no Estado do Piauí.
729 *Rev. Bras. Ci. Agrárias.*, v.3, n.4, p.376-380, 2008.
- 730
731 VIJAYARAGHAVAN, S. Sperm motility: patterns and regulation. In: *Introduction to*
732 *mammalian reproduction*. Kluwer Academic Publishers: Boston, 2003, p.79-91.
- 733
734 ZÚCCARI, C.E.S.N.; LEITE, P.A.; PASSOS, T.S. *et al.* Correlação entre métodos de
735 avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino
736 criopreservado. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.10, p.678-684, 2009.
- 737
738