

O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado

The effect of equilibration time on the quality of cryopreserved goat semen

BITTENCOURT, R. F.^{1*}; RIBEIRO FILHO, A. L.², ALVES, S. G. G.²; BISCARDE, C. E.²;
VASCONCELOS, M. F.²; OBA, E.¹

1-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil

2-Escola de Medicina Veterinária – UFBA, Salvador-BA, 40170-110, Brasil.

*Endereço para correspondência: rfbvet@yahoo.com.br

RESUMO

Sete amostras de sêmen de um caprino adulto, colhidas com a utilização de vagina artificial, foram submetidas à criopreservação, com o objetivo de se verificar a influência do tempo de equilíbrio sobre a congelabilidade do sêmen caprino. O tempo de equilíbrio foi considerado o tempo total em que os espermatozoides foram mantidos em contato com o glicerol e com os demais componentes do diluidor, previamente à congelação. Logo depois da colheita e avaliação, o sêmen foi diluído e envasado em palhetas de 0,25mL, com dose inseminante de 100×10^6 espermatozoides. Essas foram encaminhadas para o resfriamento, com uma curva média de $-1,07^\circ\text{C}/\text{min}$, até atingirem a temperatura de 5°C (30min de período de resfriamento). Depois desse período, as amostras foram mantidas à temperatura de 5°C até completarem 1, 2, 3 e 4h de tempo de equilíbrio total, respectivamente G1, G2, G3 e G4. Posteriormente, congeladas em vapor de nitrogênio líquido. A descongelação foi realizada em banho-maria a 37°C por 30s. Através dos parâmetros espermáticos estudados, o tempo de equilíbrio de 2h (G2) foi o que obteve os melhores índices de viabilidade espermática após o processo de congelação-descongelação, quando comparado aos demais grupos avaliados.

Palavras chaves: Caprino; sêmen; criopreservação; tempo de equilíbrio.

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen dos mamíferos é caracterizada por ter uma

SUMMARY

Seven semen samples of one adult goat were collected by artificial vagina and cryopreserved, with the objective of verifying the effect of the equilibration time on the freezability of goat semen. The equilibration time was considered as the total spermatozoa remain in contact with glycerol and all the others diluent components. After evaluation, the semen was diluted and packed in 0.25 ml straws, provided the dose of 100 million of motile spermatozoa. Then, the samples were cooled at $1,07^\circ\text{C}/\text{min}$ to 5°C (30min of cooling period). After that, the samples remained at 5°C until completed 1, 2, 3 and 4h of total equilibration time, respectively G1, G2, G3 and G4, where then the straws containing the semen were frozen in liquid nitrogen vapour. The thawing was accomplished in 37°C water bath for 30s. The equilibration period of 2h (G2) was the protocol that promoted the best indexes of sperm viability after the process of freezing-thawing, when compared with the other studied groups.

Keywords: Goat; semen; cryopreservation; equilibration time.

reconhecida queda de fertilidade em comparação ao sêmen fresco. Isso se deve

tanto a uma menor viabilidade celular pós-descongelamento, como também às alterações subletais que ocorrem em uma parte dos espermatozoides submetidos ao processo (WATSON, 2000).

Desde que o sêmen caprino foi congelado pela primeira vez por Smith e Polge (1950), e esses autores se reportaram à fertilidade pós-descongelamento do sêmen dessa espécie como muito baixa para ser considerada de valor prático, muitas investigações têm sido desenvolvidas sobre a criopreservação do sêmen caprino e todas as etapas envolvidas no processo (LEBOEUF et al., 2000).

O tempo de equilíbrio é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com o glicerol e todos os demais componentes do diluidor, previamente a congelamento. Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no meio diluidor (SALAMON e MAXWELL, 2000). Segundo Oettlé (1986), um apropriado período de equilíbrio, assim como adequadas taxas de diluição e resfriamento celular, são fatores fundamentais para a prevenção do surgimento de alterações espermáticas durante o processo de criopreservação espermática. Com a otimização dos processos iniciais de pré-congelamento, pode-se aumentar os índices de viabilidade espermática pós-descongelamento.

Alguns trabalhos demonstram que o período de equilíbrio ao qual o sêmen caprino deve ser submetido, previamente a congelamento, vai até 4h de tempo total, enquanto períodos maiores (5 a 6h) não promoveram melhorias no sêmen caprino descongelado. (SINHA et al., 1992; DUTTA et al., 1996).

Deka e Rao (1986) encontraram menores taxas de alterações de acrossoma nos espermatozoides submetidos a um menor tempo de equilíbrio (1h), quando comparados com o sêmen mantido por períodos maiores (3 e 5h). Entretanto, Das

e Rajkonvar (1993, 1994, 1995 e 1996) observaram que o sêmen que permaneceu por 3h em tempo de equilíbrio obteve melhores índices de motilidade pós-descongelamento e de lesões acrossomais, quando comparado ao sêmen que permaneceu por 1 e 6h. Baruah et al. (2003) não verificaram diferenças significativas em relação às taxas de motilidade espermática e lesões acrossomais, para as amostras de sêmen equilibradas por 0,5, 1 e 1,5h.

Nesse conteúdo, este estudo objetiva verificar a influência do tempo de equilíbrio na manutenção da viabilidade espermática, após o processo de congelamento-descongelamento, devido à variabilidade das informações contidas na literatura especializada.

MATERIAIS E MÉTODOS

O local e os animais

Este estudo foi realizado no Hospital de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (EMEV-UFBA), compreendendo os meses de Março a Maio de 2005. Todos os procedimentos de avaliação espermática, manipulação seminal, congelamento, armazenamento e descongelamento do sêmen foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal recomendados pelo COBEA (2005).

Para o experimento foi utilizado um reprodutor adulto, sem raça definida. Para tanto, o animal foi submetido a uma avaliação clínica, exame físico do sistema reprodutivo e exame andrológico do ejaculado. O reprodutor foi manejado de forma intensiva, com fornecimento diário de concentrado balanceado, forragem verde, sal mineral e água *ad libitum*. O controle sanitário foi realizado

periodicamente, seguindo um esquema pré-estabelecido pelo setor.

Colheita e avaliação do sêmen pré-congelamento

As colheitas de sêmen (sete ejaculados) foram realizadas em dias alternados, no final da tarde, com a utilização de vagina artificial, tendo como manequim uma fêmea em estro natural ou induzido. O ejaculado foi colhido em tubos graduados, protegidos da luz e da temperatura ambiente por um protetor térmico. Após a colheita da amostra, o sêmen foi encaminhado imediatamente para o laboratório de processamento e colocado em banho-maria, à temperatura de 37°C, enquanto se realizava o exame físico do ejaculado (volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática).

O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta do sêmen no tubo graduado e registrado em mililitros (mL); e o turbilhonamento (escala de 0 a 5) foi verificado pela observação de uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida em mesa aquecedora a 37°C, ao microscópio em objetiva com aumento de 100 a 200X. O vigor (escala de 0 a 5) e a motilidade total (0 a 100%) foram avaliados pela observação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula em objetiva de 200X, tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (HENRY e NEVES, 1998).

Para o cálculo da concentração espermática, empregou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 10µL para 4mL (1:400) de solução de formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957).

A amostra de sêmen fixada na solução de formol-salina tamponada utilizada para cálculo da concentração foi empregada para avaliação da morfologia espermática, por isso o cuidado de manter o tubo com formol salina sobre a placa aquecedora para que fossem evitadas alterações na

célula espermática, provocadas por choque-térmico dos espermatozóides, ao entrarem em contato com o formol. O estudo da morfologia espermática foi realizado posteriormente utilizando-se a técnica de contraste de fase (aumento de 1.000X), onde foram contadas 100 células para determinação do percentual de espermatozóides normais e anormais, sendo classificados individualmente em defeitos menores e defeitos maiores, conforme método descrito por blom, (1973).

O número total de espermatozóides no ejaculado foi obtido, multiplicando-se o volume do sêmen (mL) pela concentração espermática/mL. Após o exames físicos os ejaculados foram destinados às etapas de processamento para congelamento.

Diluição e diluidor

Realizado o exame físico do ejaculado, a amostra foi pré-diluída em um tubo graduado, na proporção de uma parte de sêmen para duas partes de meio diluidor (1/3). O diluidor e o tubo foram aquecidos em banho-maria a 37°C, previamente à diluição inicial, a fim de proteger o sêmen durante a manipulação. Então, foram avaliadas a motilidade espermática e vigor por meio de microscopia óptica, com aumento de 200 a 400X, com o intuito de verificar possíveis alterações nas características seminais durante o processo de diluição. Após procedida a concentração espermática, por contagem em câmara de Neubauer, foi calculado o número de doses (100 milhões de espermatozóides/dose) e realizado o ajuste do volume final do diluidor a ser adicionado. Seguindo-se a diluição final, o sêmen foi envasado em palhetas de polietileno de 0,25mL. O diluidor de congelamento teve como concentração final 6% de glicerol e 20% de gema de ovo.

O diluidor foi preparado de acordo com Roberts (1986) e sofreu algumas modificações na concentração do glicerol (redução de 7 para 6%) e também foi

alterado o antibiótico utilizado, substituindo-se a penicilina e estreptomicina por 13,40mg de sulfato de gentamicina (Schering-Plough S/A, São Paulo, SP).

Resfriamento do sêmen e tempo de equilíbrio total

Feito o envase do sêmen diluído nas palhetas, essas foram encaminhadas para o resfriamento conforme Barbosa (1999). Nesse caso, as palhetas foram colocadas horizontalmente sobre plataformas de isopor, dentro de uma geladeira de 280L, com temperatura interna estabilizada entre 4 e 5°C. Assim, as amostras foram submetidas a uma curva de resfriamento de -1,07°C/min, em que, após, aproximadamente, 30min as amostras chegavam a temperatura de 5°C. Depois desse período as amostras foram mantidas à temperatura de 5°C até completarem 1, 2, 3 e 4h de tempo de equilíbrio total (TE), formando, respectivamente, os quatro grupos experimentais: grupo G1 (1h de TE); grupo G2 (2h de TE); grupo G3 (3h de TE); grupo; G4 (4h de TE).

O tempo de equilíbrio foi considerado o tempo total em que os espermatozoides foram mantidos em contato com o glicerol e com os demais componentes do diluidor, previamente à congelação (SALAMON e MAXWELL, 2000)

Congelação do sêmen

Após os diferentes períodos de equilíbrio, as palhetas foram colocadas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido a 5cm da lâmina líquida, por 20min, dentro de uma caixa de isopor. Essa, com 40cm de comprimento por 32cm de altura e 20cm de largura, continha 4cm de nitrogênio líquido (N²). Após os 20min, à temperatura do vapor de N², as palhetas foram mergulhadas no N² e colocadas em raques devidamente identificadas e armazenadas em botijão criogênico até o

momento da descongelação, que ocorreu 3,5 meses pós-congelação.

Descongelação e características microscópicas do sêmen.

A descongelação foi realizada incubando as palhetas com sêmen em banho-maria a 37°C por 30s. Depois de descongeladas, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade total, progressiva e vigor espermático (com a colocação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, em microscópio com aumento de 200 e 400X).

Teste de termoresistência

Todas as partidas de sêmen foram submetidas ao teste de termoresistência de acordo com a metodologia descrita pelo CBRA para a espécie caprina (HENRY e NEVES, 1998). Para a realização do teste (TTR) as amostras descongeladas foram mantidas em tubos Eppendorf fechados, por 5min, em banho-maria com temperatura estabilizada em 37°C, enquanto eram efetuadas as avaliações de motilidade total, progressiva e vigor espermático.

Morfologia espermática do sêmen descongelado

Para a avaliação de danos na morfologia espermática (alterações de cabeça e cauda), foram retiradas alíquotas de 20µL de cada um dos quatro tratamentos, após a descongelação, e colocadas em tubos com 2mL de formol-salina tamponado, sendo posteriormente avaliadas, mediante preparação úmida entre lâmina e lamínula, utilizando-se microscopia de contraste de fase em aumento de 1.000X. Para tanto, foram contadas 100 células espermáticas, computando e classificando individualmente as alterações encontradas levando em conta defeitos menores e defeitos maiores, segundo BLOM, (1973).

Delineamento e análise estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, tendo sido os ejaculados considerados repetições (n=07) e os protocolos de processamento do sêmen (G1; G2; G3 e G4) considerados tratamentos (n=4). Os cálculos de média, desvio-padrão, análise de variância foram realizados conforme Sampaio (1998) e, para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Com esse objetivo, realizou-se a seguinte seqüência de análises:

1- A verificação dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do PROC MEANS.

2- As variáveis, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos de acrossoma e defeitos totais, a motilidade espermática total e progressiva e vigor espermático foram comparados, nos diferentes grupos (G1; G2; G3; G4), por meio do PROC GLM, utilizando-se o teste de Student – Newman – Keuls (SNK, P<0,05).

RESULTADOS

Características do sêmen a fresco

Os valores médios referentes ao volume (VOL), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), vigor (VIG) e concentração (CONC) do sêmen a fresco e as respectivas médias nas sete amostras encontram-se na Tab. 1.

Tabela 1. Valores médios encontrados para as características microscópicas (volume, motilidade, vigor e concentração) do sêmen a fresco nos sete ejaculados.

Amostras	VOL	MT(%)	MP(%)	VIG(0-5)	CONC(x10 ⁹ /mL)
Ejaculado 1	0,80	65,00	60,00	4,00	3,81
Ejaculado 2	0,60	60,00	55,00	4,00	2,42
Ejaculado 3	0,80	65,00	60,00	4,00	2,20
Ejaculado 4	0,50	55,00	50,00	4,00	4,68
Ejaculado 5	0,40	65,00	60,00	4,00	2,90
Ejaculado 6	0,40	65,00	60,00	4,00	3,00
Ejaculado 7	0,50	65,00	60,00	4,00	4,86
Média ± S	0,57 ± 0,17	62,86 ± 3,93	57,86 ± 3,93	4,00 ± 0,00	3,41 ± 1,06

As médias encontradas para volume e motilidade espermática (0,57mL e 62,86%) foram inferiores aos valores médios preconizados pelo CBRA (HENRY e NEVES, 1998), para a espécie caprina, que são de 0,8 e 80%, para volume e motilidade, respectivamente. Ao mesmo tempo, as médias encontradas para o vigor (4,00) e concentração espermática (3,41 x 10⁹/mL) foram superiores às sugeridas pelo CBRA (HENRY e NEVES, 1998), que são de 3,00 para o vigor e 2,00 x 10⁹ para a concentração espermática.

Em comparação com este estudo, Ferrari (1993) em seu trabalho também encontrou valores superiores para a motilidade espermática (77,00%), ao utilizar caprinos adultos da raça Saanem. Entretanto, o percentual encontrado nesse experimento, para a motilidade espermática (62,86%), foi semelhante ao observado em estudo realizado por Machado e Simplicio (1991), que encontraram, para caprinos adultos da raça Alpina, um percentual de 61,1% para essa característica. Porém, em relação à concentração espermática, foi verificado um

valor médio bem superior ($3,41 \times 10^9/\text{mL}$) aos $2,92 \times 10^9/\text{mL}$ registrados por aqueles autores.

Lima et al. (1991), trabalhando com caprinos da raça Saanem, encontraram valores semelhantes para motilidade espermática (68,5%). No entanto, as médias para volume do ejaculado (1,54mL) e

concentração espermática ($4,5 \times 10^9/\text{mL}$) foram superiores às respectivas médias verificadas neste experimento.

Os valores para as características morfológicas, defeitos maiores (DM), defeitos menores (DME) e defeitos totais (DT) estão sumarizados na Tab. 2.

Tabela 2. Características morfológicas de defeitos maiores (DM), defeitos menores (DME) e defeitos totais (DT) do sêmen a fresco nos sete ejaculados e suas respectivas médias.

Amostras	DM (%)	DME (%)	DT (%)
Ejaculado 1	4,50	11,50	16,00
Ejaculado 2	2,50	12,50	15,00
Ejaculado 3	3,00	15,00	18,00
Ejaculado 4	1,50	8,00	9,50
Ejaculado 5	2,50	6,50	9,00
Ejaculado 6	1,00	7,00	8,00
Ejaculado 7	1,50	8,00	9,50
Média ± S	2,36 ± 1,18	9,79 ± 3,23	12,14 ± 4,05

A média de defeitos totais do sêmen a fresco verificada permaneceu dentro do considerado desejável (menor ou igual a 20%), para a seleção de bodes como reprodutores, segundo Herny e Neves (1998). E foi inferior aos dados citados por Azerêdo (1999), que encontrou 16,13% de DME, 6,85% de DM, perfazendo um total de 22,98 % de DT.

Santos (2001) relatou 19,3 % de DT para o sêmen recém colhido de bodes da raça

Alpina, valores superiores aos observados no presente trabalho.

Características microscópicas do sêmen descongelado

Na Tab. 3, encontram-se as médias de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor para o sêmen a fresco e para os quatro grupos (G1; G2; G3; G4), logo após a descongelação.

Tabela 3. Médias de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor para os espermatozoides do sêmen a fresco, e para os quatro tratamentos (G1; G2; G3; G4), logo após a descongelação.

TRATAMENTO	MT (Média ± S)	MP (Média ± S)	VIGOR (Média ± S)
G1	34,28 ± 09,32 C	30,00 ± 10,00 C	3,07 ± 0,34 B
G2	43,57 ± 04,75 B	38,57 ± 04,75 BC	3,42 ± 0,44 AB
G3	41,42 ± 08,99 BC	37,14 ± 08,59 BC	3,35 ± 0,62 AB
G4	45,00 ± 05,77 B	40,71 ± 06,07 B	3,42 ± 0,73 AB

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

Todos os grupos experimentais apresentaram valores médios de MP e

vigor iguais ou superiores aos mínimos recomendados para o sêmen caprino

descongelado, de 30% para MP e 2 para o vigor, assim como preconizado pelo CBRA (HENRY e NEVES, 1998).

Logo após a descongelação, foi encontrada diferença significativa, para as características de MT, MP e vigor entre alguns grupos estudados (Tab. 3).

Conforme a Tab. 3, as amostras de sêmen submetidas aos protocolos G2, G3 e G4 não diferiram ($P>0,05$) entre si, ao se comparar à MT desses grupos experimentais. Os menores valores numéricos em relação a MT foram encontrados nos grupos G3e G1. Esses grupos não apresentaram diferenças significativas entre si. E o grupo G4 obteve melhores ($p<0,05$) índices de MT e MP

quando comparado ao protocolo G1.

Ao se analisar as médias obtidas para a MP, os grupos G2, G3 e G4, novamente, não apresentaram diferenças significativas entre si. O grupo G1 que também obteve o menor resultado para essa característica, foi semelhante ($P>0,05$) não só ao grupo G3, mas também ao protocolo G2 (Tab. 3). Não foi observada diferença estatística para o vigor espermático entre os diferentes grupos experimentais (Tab. 3).

Na Tab. 4, encontram-se as médias de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor para os quatro grupos (G1,G2, G3, G4), logo após o teste de termoresistência (TTR).

Tabela 4. Médias de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor para os espermatozoides dos quatro tratamentos (G1; G2; G3; G4), logo após o teste de termoresistência (TTR).

TRATAMENTO	MT (Média ± S)	MP (Média ± S)	VIGOR (Média ± S)
G1	35,00 ± 9,12	30,00 ± 9,12	3,00 ± 0,28
G2	42,14 ± 4,87	38,57 ± 2,43	3,42 ± 0,18
G3	41,42 ± 8,99	37,14 ± 8,59	3,35 ± 0,37
G4	42,50 ± 4,18	38,33 ± 5,16	3,33 ± 0,68

Após o teste de termoresistência (TTR), a diferença ($P<0,05$) que havia entre os grupos experimentais logo após a descongelação, em relação ao percentual total de células móveis, deixou de existir ($P>0,05$). Também, após o TTR, não foi verificada diferença ($P>0,05$) no vigor espermático, entre os diferentes grupos (Tab. 4).

Os resultados observados no presente estudo confirmam os obtidos por Westhuysen (1978) que verificou que maiores tempos de equilíbrio proporcionaram melhores índices de motilidade pós-descongelação quando comparado a períodos de equilíbrio inferiores.

Corroborando com esse fato, Sinha et al. (1992) obtiveram os melhores resultados de motilidade espermática pós-

descongelação, utilizando um tempo de equilíbrio (TE) de 4h, quando comparado àquele obtido pelo grupo submetido a um tempo de equilíbrio inferior.

Das e Rajkonvar (1993) e Das e Rajkonvar (1995) observaram que o sêmen mantido por 3h em TE obteve melhores índices de motilidade pós-descongelação, em relação ao sêmen submetido a 1h de TE. Esses dados discordam dos encontrados no presente trabalho em que, quando comparados os mesmos tempos de equilíbrio (1 e 3h), não foi verificada diferença significativa para os parâmetros espermáticos pós-descongelação.

Dados conflitantes aos verificados neste trabalho que obteve maiores ($P<0,05$) percentuais de células vivas com um maior TE (4h) em relação a um inferior TE (1h), também foram relatados por SAHNY e

ROY (1972) que não encontraram diferença ao testar tempos de equilíbrio que variaram de 1 até 6h de TE.

Os dados encontrados, na literatura, sobre a influência do período de equilíbrio sobre os índices de motilidade espermática pós-descongelação são bastante conflitantes, por haver diversos fatores que atuam influenciando os resultados finais, já que cada experimento utiliza uma metodologia diferente. Segundo Salamon e Maxwell (1995), o tempo de equilíbrio ideal, a que os espermatozoides devem ser mantidos, depende da taxa de resfriamento que o sêmen será submetido previamente à

congelação. E, ainda conforme Lightfoot e Salamon (1969), sobre o TE a ser utilizado existe a interferência da composição da fonte de açúcar presente no diluidor e da concentração de glicerol utilizada.

Características morfológicas do sêmen descongelado

Na Tab. 5, encontram-se as médias de defeitos menores (DME), defeitos maiores (DM), defeitos de acrossoma (AC) e defeitos totais (DT) para o sêmen a fresco e para os quatro grupos (G1, G2, G3, G4), logo após a descongelação.

Tabela 5. Médias de defeitos maiores (DM), defeitos menores (DME), defeitos de acrossoma (AC) e defeitos totais (DT) para os espermatozoides do sêmen a fresco, e para os quatro tratamentos (G1, G2, G3, G4).

TRATAMENTO	DME (Média ± S)	DM (Média ± S)	AC (Média ± S)	DT (Média ± S)
G1	15,71 ± 03,98 B	14,14 ± 10,89 B	11,71 ± 10,24 AB	29,85 ± 11,71 BC
G2	11,28 ± 05,76 AB	11,42 ± 08,20 B	08,42 ± 08,34 A	22,71 ± 10,33 B
G3	11,71 ± 08,11 AB	25,57 ± 06,67 C	20,42 ± 06,29 BC	37,28 ± 10,56 C
G4	07,00 ± 04,24 A	27,85 ± 09,44 C	24,71 ± 09,19 C	34,85 ± 08,53 BC

Valores seguidos de letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

As médias de defeitos menores, defeitos maiores e defeitos totais, observadas para todos os grupos (Tab. 5), ficaram acima dos valores máximos recomendados pelo CBRA (HENRY e NEVES, 1998.), para o sêmen descongelado da espécie caprina, de 20% para o número de defeitos totais e 10% de defeitos maiores.

Em todos os parâmetros utilizados para avaliar o grau de lesão ocorrido na morfologia espermática, observou-se uma clara interferência do período de equilíbrio, ao qual o sêmen foi submetido (Tab. 5). Pode-se observar que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos G1 e G2, em nenhuma das classificações de defeitos espermáticos avaliadas (DME, DM, AC e DT). Essa semelhança também ocorreu entre os grupos G3 e G4.

Nota-se que os grupos que permaneceram por 1 (G1) e 2h (G2) em TE, foram

semelhantes entre si ($P > 0,05$) e obtiveram os menores índices de defeitos maiores ($P < 0,05$), quando comparados aos grupos que permaneceram por 3 e 4h (G3 e G4) (Tab. 5).

Resultados semelhantes foram encontrados por BARUAH et al. (2003) que não verificaram diferença significativa, em relação às taxas de motilidade espermática e lesões acrossomais, para as amostras de sêmen equilibradas, por 0,5, 1 ou 1,5h, períodos esses com intervalos próximos aos utilizados no G1 (1h) e G2 (2h).

Ao se analisar as médias de defeitos de acrossoma (Tab. 5), observa-se que também foram menores para o sêmen congelado, com os menores tempos de equilíbrio (G1 e G2) em relação ao sêmen mantido por 4h (G4) em equilíbrio.

Ainda em relação às lesões acrossomais, o grupo que permaneceu por 2h em equilíbrio

(G2) obteve os menores índices de lesões acrossomais ($P < 0,05$), quando comparado aos grupos com períodos de equilíbrio superiores (G3 e G4).

Das e Rajkonvar (1994) e Das e Rajkonvar (1996) obtiveram menores índices de lesões acrossomais, utilizando 3h de tempo de equilíbrio, em relação ao sêmen congelado após 1h de equilíbrio. Essas observações discordam dos resultados obtidos no atual estudo, em que para os mesmos protocolos (1 e 3h de TE) não foi verificada diferença significativa para o percentual de lesões acrossomais.

No entanto, o menor ($P < 0,05$) índice de AC obtido para o G1 em relação ao G4 corrobora com o experimento conduzido por Deka e Rao (1986) que, apesar de terem obtido maiores ($P < 0,05$) médias de motilidade espermática pós-descongelamento, para o sêmen submetido a um tempo de equilíbrio superior, alcançaram menores ($P < 0,05$) índices de alterações de acrossoma, para a amostra que permaneceu por 1h em estabilização.

Os maiores valores numéricos de MT e MP foram obtidos pelos grupos G2 e G4, tanto na descongelamento como após o TTR (Tab. 3 e Tab. 4). E, apesar da semelhança ($P > 0,05$) observada para as variáveis (MT e MP) entre os grupos (G2 e G4), no G4 foi verificada uma maior ($P < 0,05$) incidência de defeitos maiores e

acrossomais nos espermatozoides, quando comparado com o G2 (Tab. 5).

CONCLUSÕES

O estudo apresentado demonstrou a influência do tempo de equilíbrio, à temperatura de 5°C , ao qual foi submetido o sêmen, sobre a morfologia espermática após o processo de criopreservação, em que o sêmen mantido por tempos de equilíbrio superiores (G3 e G4) apresentou maiores ($P > 0,05$) índices de defeitos maiores quando comparado ao sêmen submetido a tempos de equilíbrio inferiores (G1 e G2).

O tempo de equilíbrio de 2h (G2) foi o protocolo que promoveu os melhores índices de viabilidade espermática após o processo de congelamento-descongelamento, obtendo os menores valores numéricos para os defeitos maiores, defeitos de acrossoma e defeitos totais quando comparado com os demais grupos avaliados.

Agradecimentos:

Esse projeto foi desenvolvido com o apoio da FAPESB, CAPES, Laboratório Tecnopec e a Agrofacil Produtos Agropecuários LTDA.

REFERÊNCIAS

AZERÊDO, G.A. de. **Uso de sondas fluorescentes na avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozoides caprinos, submetidos à congelamento na presença e ausência de plasma seminal.** 1999. 71f. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP.

BARBOSA, L. P. **Avaliação de diferentes diluidores e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação**

artificial em caprinos da raça Alpina. 1999. 71p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

BARUAH, C.K.; BISWAS, R.K.; DEKA, B.C.; BORGHAIN, B.N. Effect of glycerol equilibration periods on quality of frozen semen in Beetal x Assam local crossbred goats. **Indian Veterinary Journal**, v.80, n.8, p.763-765, 2003.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383 – 391, 1973.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Princípios éticos na experimentação animal** Disponível em:<<http://www.cobea.org.br/etica.htm>>. Acesso em Agosto de 2005.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. A study on the characteristics of Beatal buck semen and its freezability. **Journal of Veterinary Physiology and Allied Sciences**, v12, n.2, p.6-16, 1993.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Acrosomal changes of buck spermatozoa at different periods of equilibration and after freezing with skimmed milk egg yolk glycerol extender. **Journal of the Assam Veterinary Council**, v.4, p.34-37, 1994.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Effects of equilibration periods on the motility of frozen buck semen in raffinose egg yolk glycerol extender. **Indian Journal of Animal Research**, v.29, n.2, p.141-144, 1995.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Acrosomal changes of buck spermatozoa after equilibration and freezing in egg yolk citrate glycerol extender. **Indian Veterinary Journal**, v.73, n.1, p.35-40, 1996.

DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of glycerol level in Tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. **Theriogenology**, v.26, n.2, p.231-238, 1986.

DUTTA, S.; GHOSH, B.B.; BONDYOPADHYAY, S.K.; CHOUDHURY, R.R.; BASU, S.; GUPTA, R.D. Effect of different extenders, glycerol levels and equilibration times on deep-freezing of buck semen. **Indian Journal of Animal Health**, v.35, n.1, p.35-38; 1996.

FERRARI, S. Dois tipos de diluidores e dois métodos de congelamento de sêmen de caprinos (*Capra hircus*, LINNAEUS, 1758). 1993. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinário) – Universidade de São Paulo. São Paulo-SP.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar espermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, n. 76, p. 84 – 97, 1957.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

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

LIGHTFOOT, R..J.; SALAMON, S. Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. **Australian Journal of Biological Science**, v.22, p.1547-1560, 1969.

LIMA, S.; MORAES, G.V.; MACEDO, F.A.F. Avaliação quali-quantitativa do sêmen de caprinos, colhido em diferentes épocas do ano. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 28, 1993. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 1991. p.470.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Efeito do tipo racial e da época do ano sobre o ejaculado de caprinos criados em região semi-árida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1991. p.433.

OETTLÉ, E.E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.145-150, 1986.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3.ed. Michigan: Edwards Brothers, 1986. 981p.

SAHNI, K.L.; ROY, A. A study on the effect of deep-freezing (-79 deg C) on post-thawing revival of sheep and goat spermatozoa. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.42, n.2, p.102-105, 1972.

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, p.185-249, 1995.

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

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998. 221p.

SANTOS, A.D.F. **Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo**. 2001. 61f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

SAS. User`s guide: statistics, version 5. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 956p.

SINHA, S.; DEKA, B.C.; BORGOHAIN, B.N.; TAMULI, M.K. Study on freezing of goat semen in skim milk extender with different glycerol levels and equilibration periods. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.13, n.1, p.38-41, 1992.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.482-492, 2000.

WESTHUYSEN, J.M. VAN DER. Observations on the deep-freezing of Angora goat semen. **South African Journal of Animal Science**, v.8, n.2, p.111-113, 1978.