



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CAMPUS II
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ALINE FRANCELINA DE QUEIROS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS COMBINAÇÕES DE
CRIOPROTETORES E DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL
NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

AREIA

2018

ALINE FRANCELINA DE QUEIROS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS COMBINAÇÕES DE
CRIOPROTETORES E DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL
NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva.

**AREIA
2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

Q3a Queiros, Aline Francelina de.
Avaliação do efeito das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal na criopreservação de sêmen caprino / Aline Francelina de Queiros. - Areia, 2018.
53 f.

Orientação: Sildivane Valcácia Silva.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Centrifugação seminal. 3. Congelação - sêmen. 4. Espermatozoide. 5. Fosfolipase
A. I. Silva, Sildivane Valcácia. II. Título.

UFPB/BC

ALINE FRANCELINA DE QUEIROS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS COMBINAÇÕES DE
CRIOPROTETORES E DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL
NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do Brejo Paraibano.

APROVADA EM 27/02/2018

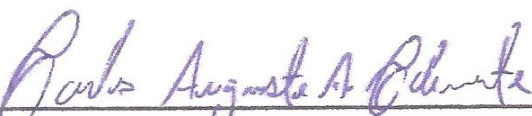
BANCA EXAMINADORA



Profa Dra. Sildivane Valcácia Silva
CBIOTEC/UFPB
Orientadora



Dr. Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira
Examinador



Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Examinador

*Aos meus pais Francisco e Lucinei, minha irmã
Alana, e toda a minha família, pelo apoio,
compreensão, carinho e amor.*

Amo vocês!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por ouvir todas as minhas orações em momentos difíceis e estar sempre ao meu lado me protegendo.

Aos meus pais Francisco Francelino dos Santos e Lucinei Queiros dos Santos (Painho e Mainha) meus melhores amigos e incentivadores, por tamanha dedicação, exemplo e amor; pelo sacrifício para que eu concluísse mais uma etapa de minha vida, apoiando todas as minhas decisões. A vocês minha eterna gratidão.

A Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos.

A UFPB campus Bananeiras, ao professor Carlos Clemente e sua equipe (Amanda, Mirian, Deyvisson) por todo suporte, pelo uso de suas instalações e equipamentos, pelo prazer de inaugurar o seu laboratório de reprodução para a realização do experimento. Agradeço em especial ao colega Pedro Lemos, pela parceria diária com as colheitas e companheirismo. Ao setor de caprinocultura, aos tratadores, e a todos que colaboraram.

Ao laboratório de reprodução do hospital veterinário da UFPB, campus Areia, pelo uso de suas instalações; ao setor de caprinocultura, na pessoa do professor Ariosvaldo e Paulo, por disponibilizarem os animais; aos tratadores por colaborarem com as colheitas e ao LAPOA, por ceder suas instalações e equipamentos para realização do projeto piloto.

Ao LABRA (UFPB) e ANDROLAB (UFRPE), por ceder suas instalações e equipamentos, que foram de suma importância para a conclusão do experimento.

A minha orientadora e amiga Sildivane Valcácia pela orientação, disponibilidade e atenção com que sempre me atendeu. Por ajudar pacientemente com as minhas dúvidas e questionamentos intermináveis e principalmente, pelo carinho e sensibilidade com que trata seus alunos além da universidade. És um ser humano incrível! Exemplo de pessoa e profissional.

Aos meus avós, tios e primos, que em muitos momentos assumiram a forma de pais, confiando todas as suas fichas em mim, o meu muito obrigado.

Ao meu primo Everton Quirino pelo apoio, incentivos constantes e principalmente pelo carinho. A minha prima Grasiete Queiroz, pelo companheirismo nos momentos em que a tarefa parecia grande, quase impossível, pude compartilhar com você minhas angústias e inquietações. E principalmente, por me mostrar que temos

sempre que olhar para o outro e oferecer não o que esperamos receber, mas sim o que o outro realmente precisa.

Aos colegas labrianos, pelo acolhimento e todo conhecimento compartilhado, em especial Alex Rique, Camilla Flávia e André Tork, sem os quais seria impossível a realização dessa pesquisa. Muito obrigada pelo apoio, incentivo e amizade! Vocês fizeram com que tudo ficasse mais leve e divertido.

Aos colegas do curso de mestrado (José Neto, Carla Caroline, Samara e Raíssa) pela troca de experiências e conhecimento, em especial a Adriano pela disponibilidade, gentileza e amizade.

Aos meus amigos de graduação: Élide Ramalho, Érica Oliveira, Edla Íris, Jocélio, Ricardo, Segundo, Aldcejam, Morgana, Bismark, Luis Fernando e Paulo que sempre estiveram presentes, mesmo à distância, incentivando e torcendo. A amiga Ísis Daniele, pelo incentivo, torcida e principalmente pela amizade, você foi um presente que o mestrado me deu.

A CAPES, pelo apoio financeiro, e finalmente, aos animais, sem os quais não haveria experimento. E a todos cujos nomes não foram citados, mas que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e conclusão de mais essa etapa. A todos, o meu muito obrigado!

“Crê em ti mesmo, age e verá os resultados.
Quando te esforças, a vida também se esforça
para te ajudar”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes diluidores crioprotetores [Leite padrão (LP), Tris-Gema padrão (GP), Leite teste (LT) e Tris-Gema teste (GT)] e da retirada do plasma seminal sobre os parâmetros de cinética e integridade do sêmen caprino criopreservado. Foram utilizados quatro reprodutores caprinos (dois Alpinos e dois Saanen), os quais foram submetidos a regime de colheita de sêmen com auxílio de vagina artificial, três vezes por semana, durante duas semanas, compondo seis *pools* de sêmen. Cada *pool* foi fracionado em oito alíquotas, quatro amostras foram diluídas sem remoção do plasma seminal - NC (Não centrifugado) nos diferentes diluidores e quatro amostras submetidas ao processo de remoção do plasma - C (Centrifugado) por dupla centrifugação (1200g/10min). Após diluição, foram envasadas em palhetas (0,25 mL), congeladas e armazenadas em botijão criogênico a -196 °C. As amostras foram descongeladas (37 °C/30s) e avaliadas imediatamente e duas horas pós-descongelação quanto à cinética espermática através do sistema computadorizado de análise espermática (CASA), integridade de membrana plasmática (iMP) e potencial mitocondrial (PM), avaliados por microscopia de epifluorescência. Foi observada redução ($p>0,05$) da motilidade total (MT) em todos os diluidores do grupo não centrifugado; redução ($P<0,05$) da velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) nos grupos leite padrão e leite teste não centrifugados, e valores superiores para os diluidores do grupo centrifugado, com ênfase para aqueles contendo gema em sua composição. No entanto, os diluidores LP e LT dos grupos NC e C mantiveram os padrões de linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação (WOB). O deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar (BCF) sofreram influência do diluidor, apresentando valores superiores ($p<0,05$) para os grupos GPNC e GTNC. A iMP e PM não diferiram ($p>0,05$) entre os grupos, porém os diluidores GP e GT dos grupos C e NC apresentaram-se superiores índices de iMP; GPNC e GTNC apresentaram inferior PM. Assim, a remoção do plasma seminal afeta positivamente os parâmetros de avaliação seminal, e diluidor à base de gema de ovo é mais eficiente na proteção das alterações promovidas pela redução de temperatura, preservando as características desejáveis para a fertilização após criopreservação do sêmen caprino.

Palavras-chave: centrifugação; congelação; espermatozoide, fosfolipase A.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different cryoprotector extenders [Standard Skim Milk (SM), Standard Tris-Yolk egg (SE), Skim Milk Test (ST) and Tris-Yolk egg Test (TE)] and plasma seminal removal on kinetics and integrity parameters of cryopreserved goat semen. Four male goats (two Alpine and two Saanen) were used, which were submitted to semen collection with artificial vagina method, thrice per week, during two weeks, making up six pools of semen. Each pool was split in eight aliquots, four samples were diluted without removal of the seminal plasma - NC (non - centrifuged) in the different extenders and four samples submitted to the C - plasma centrifugation process by double centrifugation (1200g/10min). After dilution, they were gone packed in straws (0.25 mL), frozen and stored in cryogenic cylinder at -196 °C. Samples were thawed (37 °C/30s) and evaluated immediately and two hours post-thawing for sperm kinetics through the computerized spermatozoa system (CASA), plasma membrane integrity (iMP) and mitochondrial potential (MP) evaluated by epifluorescence microscopy. Total motility (TM) was reduced ($p>0.05$) in all no centrifuged groups; velocity average path (VAP), velocity in straight line (VSL) and velocity curvilinear line (VCL) was reduced ($p>0.05$) in the LPNC and LTNC groups; however higher values was observed in VAP, VSL and VCL to the centrifuged groups, with emphasis on the Yolk-egg extenders groups. On the other hands, the LP and LT extenders, centrifuged or non-centrifuged maintained the linearity (LIN), straightness (STR) and oscillation index (WOB). Extenders influenced the amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat-cross frequency (BCF), with higher values ($p<0.05$) for the GPNC and GTNC groups. The iMP and MP did not differ ($p>0.05$) between extenders groups, though the SE and TE extenders, centrifuged or no centrifuged, presented higher iMP and lower values to PM. Thus, seminal plasma removal positively affects seminal evaluation parameters, and egg yolk extender is more efficient at protect against cryopreservation alterations and maintain desirable fertility characteristics after goat semen cryopreservation.

Keywords: centrifugation; freezing; spermatozoa, phospholipase A.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Percentual de motilidade total e progressiva de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação	40
Tabela 2	Valores absolutos dos parâmetros de velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média (VAP) de espermatozoides caprinos criopreservados em diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação	41
Tabela 3	Valores percentuais dos parâmetros de linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação (WOB) de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação	42
Tabela 4	Valores absolutos dos parâmetros de amplitude lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar de espermatozoides (BCF) caprinos analisados nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação	42
Tabela 5	Percentual de integridade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação	43
Tabela 6	Percentual de alto potencial mitocondrial e funcionalidade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação	43
Tabela 7	Valores da viscosidade dos diluidores padrão e testes (Tris-gema e leite) nas temperaturas de 10 °C e 37 °C	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
ACPs	Agentes Crioprotetores Penetrantes
ATP	Adenosina Trifosfato
BCF	Frequência do Batimento de Flagelo
BSP	Proteínas espermáticas de touros
CASA	Sistema computadorizado de avaliação espermática
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EYCE	Egg Yolk-Coagulating enzyme
HOST	Teste Hiposmótico
IA	Inseminação Artificial
iMT	Integridade de Membrana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP	Iodeto de Propídeo
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro -1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolil
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDF	Fração de Baixa Densidade
LIN	Linearidade
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Potencial Mitocondrial
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
SBU III	Proteína da Glândula Bulbouretral Caprina
STR	Retilinearidade
TRIS	Tris (Hidroximetil)Aminometano
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VAP	Velocidade de Trajeto

VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Progressiva
WOB	Índice de Oscilação

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor que
+	Mais
±	Mais ou menos
10⁶	Milhões
10⁹	Bilhões
N₂	Nitrogênio
h	Hora
min	Minuto
g/min	Força g por minuto
mL	Mililitros
g	Gramas
kg	Quilogramas
Kcal	Quilocalorias
mg	Miligrama
μL	Micro litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
	2.1 Objetivo Geral	16
	2.2 Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
	3.1 Importância da Caprinocultura Para a Região Nordeste	17
	3.2 Características do Sêmen Caprino e sua Utilização na Inseminação Artificial	18
	3.3 Criopreservação do Sêmen Caprino	20
	3.4 Crioprotetores	21
	3.4.1 Crioprotetores Penetrantes	22
	3.4.2 Crioprotetores Não Penetrantes	22
	3.5 Importância dos Açúcares na Composição dos Crioprotetores	24
	3.5.1 Atuação dos Açúcares e Criopreservação na Célula Espermática	25
	REFERÊNCIAS	27
4	ARTIGO: Avaliação do efeito das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal na criopreservação de sêmen caprino	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da caprinocultura em nível mundial tem intensificado nos últimos anos, principalmente nos países subdesenvolvidos detentores do maior número de rebanhos. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho nacional de caprinos em 2016 alcançou 9,78 milhões de cabeças, onde a Região Nordeste abriga 93% deste efetivo. O país concentra o 22º maior rebanho de caprinos do mundo e projeta-se crescimento cinco vezes maior que o rebanho atual nos próximos 20 anos, multiplicando o rebanho para mais de 50 milhões de cabeças (IBGE, 2016).

Apesar da maior concentração na região Nordeste, os índices produtivos não expressam o potencial biológico destes animais. A utilização de biotecnologias da reprodução tem ganhado espaço ao longo dos anos, e pode tornar-se um importante instrumento na otimização do desempenho reprodutivo desses animais, permitindo ao produtor organizar seu sistema de produção e solucionar entraves de produtividade (AMER, 2010).

A criopreservação associada à inseminação artificial (IA) são técnicas que auxiliam os programas de melhoramento genético por atuar como ferramentas úteis para acelerar o ganho genético dos rebanhos. No entanto, apesar das conquistas alcançadas no campo da biotecnologia, as taxas de sobrevivência dos espermatozoides criopreservados ainda são baixas em virtude das injúrias ultraestruturais, bioquímicas e funcionais nos diferentes componentes da célula espermática (WATSON, 2000).

Para realizar a fertilização, é indispensável que os espermatozoides sejam dotados de motilidade, potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e acrossomal e núcleo celular fortemente condensado (GRAHAM; MOCÉ, 2005). Alterações à estas estruturas podem acarretar em prejuízos para a fertilidade celular

A qualidade dos diluidores crioprotetores representa um dos principais fatores relacionados à manutenção da viabilidade dos espermatozoides criopreservados e exerce influência sobre a qualidade e fertilidade das amostras congeladas (PAPA *et al.*, 2008). Neste contexto, a utilização de elementos com capacidade de fornecer um ambiente que conserve a integridade e função das membranas celulares tem sido amplamente estudada, e pode ser obtido a partir de diferentes combinações de componentes dos diluidores atribuindo sucesso à criopreservação (CELEGHINI, 2008).

A gema de ovo e o leite desnatado são rotineiramente utilizados nos diluidores seminais pelo fato de protegerem as células durante as etapas de congelamento e descongelamento, atuando principalmente sobre a membrana plasmática dos espermatozoides (PURDY, 2006).

No entanto, devido às interações das fosfolipases do sêmen caprino com algumas substâncias da gema de ovo e do leite que provocam efeitos nocivos aos espermatozoides, alguns autores recomendam a retirada do plasma seminal (CORTEEL, 1974; LEBOEUF *et al.*, 2000).

Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação de sêmen animal, estão os açúcares simples como a glicose e frutose, que além de desempenharem papel nutritivo fornecendo energia necessária para a motilidade espermática, exercem função crioprotetora (PURDY, 2006).

Segundo Celeghini (2008), o conhecimento quanto aos mecanismos de atuação dos diluidores na célula espermática ainda é limitado e a utilização de técnicas que apresentem grande acurácia, maior repetibilidade e objetividade na avaliação dos efeitos da criopreservação sobre os espermatozoides seria imprescindível para auxiliar no desenvolvimento do diluidor ideal.

Apesar dos ensaios tradicionais de avaliação seminal, como avaliação subjetiva da motilidade, avaliações de integridade e funcionalidade de membrana apresentarem certa eficiência (ALLEN, 2005), grande ênfase vem sendo dada às técnicas automatizadas, como a avaliação da motilidade (CASA) e as técnicas de marcações específicas com o uso de sondas fluorescentes, pela possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides (ARRUDA *et al.*, 2007), logo, inúmeras variáveis espermáticas podem ser avaliadas concomitantemente, com maior precisão nos resultados e diminuição no tempo de organização demandada nas técnicas clássicas (ARRUDA, 2000).

Diante do exposto, é presumível que a partir da avaliação dos efeitos da criopreservação sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial pelas técnicas de microscopia de epifluorescência e sistema computadorizado de análise espermática, seja possível determinar a composição de diluidores e técnicas eficientes para a criopreservação do sêmen caprino.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal na criopreservação de sêmen caprino.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar o efeito da criopreservação de espermatozoides caprino em diluentes à base de Tris-gema e Leite desnatado, associados a diferentes monossacarídeos (glicose e frutose), com e sem centrifugação;
- b) Mensurar o efeito da centrifugação e retirada do plasma seminal sobre os parâmetros de motilidade, integridade de membranas plasmática e mitocondrial, zero e duas horas pós-descongelamento;
- c) Mensurar o efeito de diferentes combinações de crioprotetores quanto aos parâmetros de motilidade, integridade de membranas plasmática e mitocondrial, zero e duas horas pós-descongelamento.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância da Caprinocultura para a Região Nordeste

Os caprinos estão presentes na história da humanidade, conforme atestam os diversos relatos históricos, mitológicos e bíblicos. Foi a primeira espécie de ruminantes a ser domesticada e incluída na rotina alimentar humana. Pela sua importância como produtores de carne, leite e pele, esses animais foram levados pelo homem do seu habitat natal para outras regiões, tornando-se os animais domesticados com maior distribuição geográfica (COUTO, 2003). Ao longo de décadas, a caprinocultura foi considerada uma atividade irrelevante ou de subsistência na região Nordeste do Brasil, geralmente com baixa produtividade e executada por produtores desprovidos de aporte financeiro e técnico (COSTA *et al.*, 2008).

Apesar do baixo nível tecnológico ainda presente em todo processo produtivo, a caprinocultura no Brasil, concentrada principalmente no Nordeste, tem apresentado configurações que a coloca numa posição privilegiada no cenário do agronegócio brasileiro, e expressa crescimento significativo na demanda nacional e mundial, tendo em vista a elevada capacidade de adaptação desses animais às condições do semiárido, bem como a diversidade de produtos que podem ser explorados comercialmente, como reprodutores, carnes, pele, leite e derivados (MAIA *et al.*, 2010).

Esta condição está respaldada no incremento do consumo interno, em demandas concretas de exportação de carne e de pele para diversos países, bem como na percepção de oportunidades de negócio que a atividade oferece (SOUSA, 2007; NOGUEIRA, 2010), favorecendo a geração de emprego e renda gerados direta e indiretamente, especialmente através dos projetos de incentivo à agricultura familiar (HOLANDA JUNIOR *et al.*, 2008), responsável por 67% do leite de cabra produzido no Brasil.

O mercado de leite e derivados ainda incipiente possui requisitos para tornar-se mais dinâmico. As regiões Nordeste e Sudeste são responsáveis por 92% da produção de leite caprino no país (IBGE, 2012). O pressuposto da produção de leite caprino no Brasil é de 35.740.188 litros/ano (IBGE, 2012), em média 97.918 litros/dia. E apesar da vocação natural da região Nordeste para a exploração da caprinocultura leiteira, regiões desenvolvidas são responsáveis por 26% do leite produzido por esta espécie, mostrando que, quando as condições são adequadas, esses animais apresentam alta produtividade (IBGE, 2009).

O leite de cabra apresenta qualidades que o tornam superior ao leite bovino com relação a propriedades nutricionais e terapêuticas, como exemplos, melhor digestibilidade,

alcalinidade, teor de proteínas de alto valor nutritivo, hipoalergenicidade, entre outros, que são motivos de consumo por grupos especiais como alérgicos ao leite de vaca, idosos e crianças (GARCIA; TRAVASSOS, 2012).

Além disso, e com perspectivas ainda mais promissoras, destaca-se a utilização de biotecnologias aplicadas a reprodução animal, visando o melhoramento dos rebanhos e da qualidade dos produtos, aumentando os índices produtivos.

3.2 Características do Sêmen Caprino e sua Utilização na Inseminação Artificial

O sêmen é uma suspensão celular líquida composta por espermatozoides, os gametas masculinos, e secreções das glândulas sexuais acessórias do sistema reprodutor masculino. Esses gametas são produzidos nos testículos pelo processo de espermatogênese e maturados no epidídimo (CUNNINGAH; KLEIN, 2008). É composto por substâncias orgânicas como frutose, sorbitol, inositol, ácido cítrico, fosfolipídios, glicerilfosforilcolina, prostaglandinas e proteínas. O potencial hidrogeniônico (pH) é de aproximadamente 7,0, ou seja, neutro, devido a um complexo sistema tampão; a energia necessária é proveniente dos açúcares, essenciais para preservação da motilidade e viabilidade espermática (EVANS; MAXWELL, 1987).

O plasma seminal é a porção fluida dessa suspensão, que é incorporado no momento da ejaculação (HAFEZ; HAFEZ, 2004) e tem como função transportar os espermatozoides do trato genital do macho, ativar sua motilidade e proporcionar um meio nutritivo, indispensável para assegurar a sobrevivência dessas células após sua deposição no trato reprodutivo feminino (EVANS; MAXWELL, 1990).

A produção espermática e sua variabilidade na espécie caprina é influenciada por diversas condições como raça, idade, nutrição, fotoperíodo, temperatura, ambiente e umidade (CHEMINEAU *et al.*, 1991) que o diferencia de outras espécies, sendo mais significante a produção e liberação de enzimas pelas glândulas bulbo uretrais, dispostas no plasma seminal (BEZERRA, 2009).

As substâncias EYCE (egg yolk-coagulating enzyme - enzima coaguladora da gema do ovo) e SBU-III (Proteína da glândula bulbo uretral caprina) foram identificadas como homólogas, sendo conhecidas como fosfolipase A (LEBOEUF *et al.*, 2000). Essas enzimas causam interações prejudiciais entre o plasma, a gema de ovo e o leite, liberando ácidos graxos e lisolecitinas, os quais são tóxicos para os espermatozoides. Desta forma, a prática da centrifugação torna-se a forma mais eficiente de evitar essas reações, pois separa o plasma seminal das células espermáticas e diminui a interação nociva (PURDY; GRAHAM, 2004). Entretanto, a força de centrifugação pode influenciar negativamente na integridade do

acrossoma e membrana plasmática do espermatozoide, bem como no potencial cinético, com efeitos na interação do espermatozoide com o oócito, na fertilização e na produção de embriões (MACHADO *et al.*, 2009). Para minimizar os efeitos da centrifugação, recomenda-se o uso de pré-diluidores, velocidade e tempo adequados, capazes de garantir proteção às células espermáticas durante este processo (NEVES, 2008).

A sobrevivência espermática no plasma seminal é mantida durante poucas horas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Desse modo, as características enzimáticas do sêmen e dos diluidores apropriada-se de grande interesse para a técnica de preservação e aplicabilidade do sêmen caprino (SILVA, 2011).

A utilização do sêmen congelado incrementa a técnica de IA e oferece inúmeras vantagens à indústria da produção animal; permite o armazenamento e permuta deste material entre propriedades, utiliza um único ejaculado em várias fêmeas, potencializando o que seria alcançado na monta natural; beneficia testes de progênie e a implantação de programas de controle zootécnico empregando reprodutores de elevada eficiência reprodutiva, bem como, previne a disseminação de doenças infecciosas (XAVIER *et al.*, 2009).

Ainda que permita progressos e aprimoramento na produtividade, a IA em caprinos ainda é uma biotecnologia pouco empregada no Nordeste do Brasil, quando comparada com outras espécies (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1991), devido principalmente à pequena dimensão de propagação desta técnica; imprecisão do momento de ovulação, bem como questões alusivas à utilização do sêmen.

A técnica de IA empregando sêmen fresco e refrigerado, apesar das vantagens intrínsecas ao melhoramento genético, exibe como principal limitante o curto período de viabilidade do sêmen, todavia, o sêmen congelado apresenta como fator restritivo os baixos índices de fertilidade na IA intracervical, girando em torno de 25% (MORTIMER; MAXWELL, 2004).

A redução da fertilidade com sêmen criopreservado tem sido atribuída aos processos sucedidos durante a estocagem do sêmen, onde cerca de 10 a 50% dos espermatozoides de um ejaculado não resistem a este processo e morrem (WATSON, 2000). Em função disso, o crescimento da IA utilizando sêmen criopreservado fica comprometido para a espécie caprina (VARAGO *et al.*, 2009).

Logo, para que resultados satisfatórios sejam atingidos é imprescindível que além de elucidadas as inúmeras restrições atreladas a essas biotécnicas que as particularidades acerca dos eventos fisiológicos dos espermatozoides da espécie em questão sejam consideradas (PURDY, 2006).

3.3 Criopreservação do sêmen caprino

A criopreservação é um processo onde células, tecidos ou embriões são conservados pelo frio, tendo como objetivo manter sua composição e potencial biológico por período indeterminado (PEGG, 2002). À medida que a temperatura é reduzida para 0 °C, a atividade metabólica celular é interrompida, tornando suas funções após a descongelação (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

A congelação dos espermatozoides foi iniciada com fins científicos, por Lazaro Spallanzani em 1776 (PESCH; BERGMANN, 2006). Entretanto, as explorações neste ramo foram incentivadas e as técnicas de estocagem inovadas somente após a descoberta dos crioprotetores. Desse modo, tornou-se possível a utilização de espermatozoides criopreservados para a IA a partir da congelação e armazenamento dessas células (HOLT, 2000).

Os primeiros registros da criopreservação de sêmen caprino são atribuídos a Polge e Smith e datam de 1950 (BEZERRA, 2009), onde estes autores relataram baixa fertilidade pós-descongelação, limitando sua utilização prática até o momento (LEBOEUF *et al.*, 2000).

A criopreservação é um processo complexo, que envolve equilibrar muitos fatores para obter resultados satisfatórios. É necessária a incorporação de diluentes apropriados, taxa de diluição, refrigeração e descongelação adequadas, além do conhecimento fisiológico acerca do sêmen de cada espécie para maximizar a recuperação pós-descongelação e consequentemente a fertilidade (PURDY, 2006).

O sêmen caprino pode ser utilizado a fresco (puro ou diluído), refrigerado ou criopreservado. O sêmen *in natura* apresenta maior fertilidade, mas de uso limitado a determinados períodos do ano, por tratar-se de uma espécie que apresenta estacionalidade reprodutiva. Contudo, o sêmen criopreservado pode ser estocado por longo período em nitrogênio líquido (-196 °C), pois essa temperatura permite que todos os processos biológicos e fisiológicos que ocorrem dentro e fora da célula sejam reduzidos; apresentando maior aplicabilidade (TRALDI, 2006).

Os procedimentos de congelação/descongelação acarretam danos celulares devido às mudanças na temperatura, estresse osmótico, injúrias oxidativas, formação de cristais de gelo, alterações na membrana dos espermatozoides, lesões no DNA, além da toxicidade dos crioprotetores (BORTOLOZZO *et al.*, 2008).

No sêmen criopreservado, a quantidade de células lesadas e mortas em relação ao sêmen fresco aumenta substancialmente, não obstante das técnicas de congelação e descongelação utilizadas (ORTEGA *et al.*, 2003) e da espécie trabalhada. As crioinjúrias

decorrem da interação entre as mudanças biofísicas, bioquímicas e ambientais ocorridas durante o processo de criopreservação (FICKEL *et al.*, 2007), submetendo as células criopreservadas a estresses resultantes das mudanças de volume e consequentes alterações nas concentrações de íons e eletrólitos nas soluções intra e extracelulares (STORNELLI *et al.*, 2005).

De acordo com Pesch e Bergmann (2006), as injúrias ocorridas nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides são classificadas de acordo com sua origem, onde as primárias são ocasionadas pela formação de cristais de gelo devido ao estresse térmico e secundárias pelo efeito osmótico do meio, que provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios das membranas dos espermatozoides. Nesse contexto, Chakrabarty *et al.* (2007) recomendam a adição de fontes de fosfolipídios aos crioprotetores, a fim de reduzir os efeitos prejudiciais das alterações de temperatura, concomitantemente ao uso de curvas adequadas de congelamento, que devem ser lentas o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo intracelular e rápida o equivalente para minimizar o contato da célula desidratada com os solutos (HOLT, 2000), uma vez que tais episódios afetam a sobrevivência e a fertilidade espermática (ARRUDA *et al.*, 2007).

Embora essa biotécnica apresente grande importância, ainda existem vários entraves com relação aos índices insatisfatórios de congelabilidade do sêmen caprino, o qual deve contemplar não apenas a conservação de um elevado número de espermatozoides sobreviventes, mas também a habilidade fertilizante desta população (STORNELLI *et al.*, 2005). Desta forma, se faz necessária a evolução das técnicas de congelamento que diminuam os efeitos deletérios sobre as células espermáticas.

3.4 Crioprotetores

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com a premissa de avaliar a viabilidade do sêmen caprino criopreservado e para determinação de substâncias que propiciem melhores condições para sobrevivência espermática, preservando suas características fecundantes. Um dos pré-requisitos para o sucesso da IA é o uso de diluidores do sêmen, esses compostos diferem em quantidade, eficiência e na qualidade dos componentes (DIAS, 2010).

Em geral, o crioprotetor adequado deve simular um ambiente que supra as demandas espermáticas; mimetizar a pressão osmótica do sêmen; fornecer elementos minerais e energéticos com capacidade para manter a motilidade; neutralizar os elementos tóxicos e equilibrar do pH do meio; proporcionar proteção contra o choque térmico, homeostase dos

sistemas enzimáticos e integridade das membranas, a fim de estabilizar e diminuir o extravasamento de enzimas e íons (AMANN; PICKET, 1987).

Os crioprotetores são classificados como penetrantes e não penetrantes nas células, estes são acrescidos ao meio de criopreservação com a finalidade de minimizar os estresses físicos e químicos decorrentes da refrigeração, congelação e descongelação dos espermatozoides (PURDY, 2006).

3.4.1 Agentes crioprotetores penetrantes (ACPs; Intracelulares)

São agentes que possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações entre a molécula de água e o hidrogênio, reduzindo a formação de cristais de gelo, e a concentração de soluto nos meios extra e intracelulares (DALIMATA; GRAHAM, 1997) diminuindo o ponto de congelação da solução e elevando a viscosidade da mesma. Além disso, os ACPs atuam através da substituição parcial e também pela ligação aos próprios eletrólitos à água, prevenindo a exposição do material à altas concentrações de eletrólitos (CASTRO *et al.*, 2011).

A adição de crioprotetores intracelulares tais como glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) e dimetilsulfóxido ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) ao crioprotetor resulta na congelação a temperaturas mais baixas. Isso provavelmente prolonga a perda excessiva de água das células, evitando o desenvolvimento de grandes cristais de gelo (VASCONCELOS, 2010). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na preservação por congelação (AGUIAR *et al.*, 2012).

3.4.2 Agentes crioprotetores não penetrantes (Extracelulares)

Os agentes crioprotetores não penetrantes atuam na proteção dos espermatozoides aos efeitos osmóticos, gerando um meio hipertônico que estimula a saída de água das células para o meio extracelular, reduzindo a formação de cristais de gelo no compartimento intracelular.

Algumas substâncias, como lipídeos, proteínas e macromoléculas são acrescentadas na confecção dos diluentes. Estas são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação, sem que para isso necessitem penetrar o espermatozoide (KEITH, 1998). Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são representados pelas lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e pelos açúcares (AMANN; PICKETT, 1987).

A gema de ovo é um dos constituintes mais utilizados como base dos diluentes de sêmen dos animais domésticos. Após evidências de que a gema de ovo atua de forma benéfica

à preservação dos espermatozoides submetidos a baixas temperaturas, esta foi incorporada aos protocolos de conservação seminal. Acredita-se que sua ação seja devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que se aderem à membrana celular (MOUSSA *et al.*, 2002), recompondo a perda de fosfolipídios e aparentemente coligindo a variação transitória de sua composição, por conseguinte, prevenindo que a membrana seja rompida (FARSTARD, 1996). Sariözkan *et al.* (2010) obtiveram resultados satisfatórios com a incorporação da gema de ovo ao diluidor para a espécie caprina, com elevados índices de motilidade.

Todavia, o diluente à base de leite desnatado compõe os extensores mais utilizados para sêmen caprino. De acordo com Leboeuf *et al.* (2003), este diluidor mantém a capacidade fertilizante dos espermatozoides por aproximadamente 12 a 24 horas *in vitro*.

Bergeron *et al.* (2007) relataram que as caseínas do leite diminuem a interação das proteínas do plasma com as células espermáticas, diminuindo a perda de lipídeos da membrana plasmática sofrida durante o processo de congelamento, envolvendo proteínas e não lipídeos como ocorre com diluidores a base de gema de ovo. Sua composição proteica atua como tampão e efeito quelante frente a metais pesados, havendo relatos de sua parcial proteção contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração (SALAMON; MAXWELL, 2000). Esses efeitos benéficos são atribuídos ao fosfocaseinato nativo, considerado como o componente mais eficiente em preservar a motilidade e manter a fertilidade espermática quando comparados a outros diluentes (BERGERON *et al.*, 2007).

Apesar dos benefícios que foram comprovados sobre a utilização da gema de ovo e do leite desnatado em diluentes de sêmen, alguns autores sugerem a sua utilização de forma diferenciada quando se trata do sêmen caprino, devido a presença das fosfolipases A, que interagem negativamente com ambas as substâncias (CORTEEL, 1974; LEBOEUF *et al.*, 2000). De acordo com Machado e Simplício (1995), as interações deletérias entre estas enzimas e os diluidores podem ser evitadas pela lavagem do sêmen por centrifugação para remoção do plasma seminal. No entanto, este é um procedimento complexo e se mal executado pode comprometer a qualidade das células (LEBOEUF, 2000).

Corteel (1974) observou aumento da motilidade das células espermáticas além de um maior percentual de células viáveis à estocagem quanto utilizados diluidores a base de gema de ovo após a retirada do plasma seminal. No entanto, Azerêdo *et al.* (2001) perceberam que as amostras de sêmen que não foram submetidas à retirada do plasma seminal foram melhores conservadas, tanto a fresco, como após a descongelamento. Estes autores concluíram que a remoção do plasma seminal foi prejudicial para a criopreservação do sêmen caprino, de modo

que o percentual de células móveis e com membranas plasmáticas íntegras diminuíram após a centrifugação do plasma seminal.

Apesar dos problemas relacionados, é fato que tanto os diluidores à base de gema de ovo quanto de leite possuem ação protetora quanto ao choque frio e auxiliam na manutenção da motilidade e sobrevivência dos espermatozoides criopreservados. Todavia, mais pesquisas são necessárias para avaliar a interação do plasma com esses compostos devido à grande variabilidade e inconclusividade dos achados.

3.5 Importância dos açúcares na composição dos crioprotetores

Os açúcares são utilizados como fonte energética pelos espermatozoides e auxiliam na manutenção da pressão osmótica dos diluidores (FARSHAD; AKHONDZADEH, 2008). Açúcares de baixo peso molecular, como os monossacarídeos glicose e frutose, são os mais comuns encontrados no plasma seminal mamífero, embora outros açúcares como sorbitol ou manose possam ser detectados (SETCHELL; BROOKS, 1988). Essas hexoses são formadas por uma cadeia de seis átomos de carbono ($C_6H_{12}O_6$), sendo a glicose do grupo aldeído e a frutose do grupo cetona com capacidade de produzir quatro quilocalorias de energia (NELSON; COX, 2014).

A presença de glicose ou frutose pode afetar a função do espermatozoide de várias maneiras, pois estes compostos possuem energia para uso imediato, sendo convertidas em adenosina trifosfato (ATP) através da via glicolítica e da fosforilação oxidativa mitocondrial, fornecendo metabólitos energéticos capazes de preservar a motilidade espermática (NAING *et al.*, 2010).

Além de atuarem como substrato energético, os açúcares apresentam-se como bons crioprotetores, conferindo proteção à membrana plasmática durante a congelção e a descongelção, através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem a união de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídeos. Seu mecanismo de ação baseia-se na permissividade a efeitos osmóticos sobre os espermatozoides, ou seja, restauram o percentual de água ao redor das cabeças dos fosfolipídios; promovem alterações na sua permeabilidade, evitando os danos causados pela desidratação extrema, bem como injúrias causadas pela cristalização do gelo. Contribuem para a estabilização da bicamada lipídica, reorganizando a membrana espermática e aumentando a sua fluidez; mantém ativa sua capacidade de transporte de cálcio, coibindo a

fusão de membranas e a manutenção de lipídeos em fase fluida na ausência de água (CROWE *et al.*, 1987).

Apesar de a frutose ser o substrato primário da glicólise no plasma seminal do caprino, a glicose é um excelente substrato energético para o metabolismo espermático nessa espécie (PURDY, 2006). Yildiz *et al.* (2000) estudaram os efeitos da adição de diferentes tipos de açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos) no meio diluente para congelação de espermatozoides de cães e obtiveram melhorias nos parâmetros de motilidade pós-descongelação com a adição de monossacarídeos.

3.5.1 Atuação dos açúcares e criopreservação na célula espermática

É peculiar ao sêmen criopreservado a conservação de um baixo número de espermatozoides morfologicamente normais (O'CONNELL *et al.*, 2002), bem como a redução da motilidade celular (WATSON, 2000). A perda da motilidade tem sido descrita como proveniente das lesões causadas à membrana e da disfunção mitocondrial (AURICH, 2005). Contudo, esta também pode ser determinada pelo desenvolvimento de anormalidades na cauda, desenvolvidas durante o processo de refrigeração, com evidência para aquelas relacionadas ao axonema (O'CONNELL *et al.*, 2002).

A integridade da membrana plasmática aparenta ser o componente espermático mais afetado pela criopreservação (ÁVILA-PORTILLO *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2007). Esse fato pode ser explicado pelas mudanças bruscas de temperatura que submetem as membranas a estresses ocorridos na fase de transição estrutural do estado líquido para o de gel alterando sua função (CANISSO *et al.*, 2008). Consequentemente, ocorrem danos às membranas acrossomais e mitocondriais além de reação acrossomal prematura (LEBOEUF *et al.*, 2000).

Considerando-se que a fosforilação oxidativa e o transporte de prótons são fenômenos ligados a membrana mitocondrial, é provável que a produção de ATP, que serve como fonte de energia para o batimento flagelar seja reduzida (CELEGHINI, 2008). A perda oxidativa do DNA mitocondrial e da integridade da membrana podem ser fatores relevantes para elucidar a diminuição da fertilidade e motilidade do sêmen criopreservado (CUMMINS *et al.*, 1994), visto que, se as mitocôndrias da peça intermediária do espermatozoide são responsáveis por produzir energia para assegurar a motilidade, alterações no potencial da membrana mitocondrial podem ser um bom indicador da diminuição desta função (PEÑA *et al.*, 2003).

Tal fato leva os espermatozoides com membranas plasmáticas danificadas a serem considerados incapazes de realizar o processo de fertilização (SILVA; GADELLA, 2006),

uma vez que apenas espermatozoides com membranas intactas podem sofrer capacitação e reação acrossomal (PESCH; BERGMANN, 2006).

Logo, o entendimento dos processos ligados ao funcionamento e às disfunções plasmáticas e mitocondriais pode permitir a prevenção ou a reversão desses efeitos deletérios sobre a célula (GILLAN *et al.*, 2004). Desta forma, persiste a necessidade de aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação e o desenvolvimento de diluidores que aumentem a longevidade e melhor preserve as características fecundantes do sêmen caprino pós-descongelamento. Para tal, sugere-se que o uso de monossacarídeos associado aos demais componentes dos diluidores possa ser benéfico.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 40, p. 310-329, 2005.

AGUIAR, T. D. A. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; TELES, C. H. A.; MARTINS, G. R. et al. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p.80-93, 2012.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 147,1987.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C. et al. Avaliação de sêmen fresco e congelado. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM CAPRINOS E OVINOS, 1., 2007, Gravatá, PE. **Anais...** Gravatá. Carotá Genética, 2007. CD ROOM.

AMER, H. A. Ultrasonographic assessment of early pregnancy diagnosis, fetometry and sex determination in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 226-231, 2010.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, V. 89, p. 65-75, 2005.

ÁVILA-PORTILLO, L. M.; MADERO, J. I.; LÓPEZ, C. et al. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia**, v. 57, p. 291-300, 2006.

- AZERÊDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, E. R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49-62, 2009.
- BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v.77, p.120-126, 2007.
- BEZERRA, F. S. B. **Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal área de concentração Produção e Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró. 2009.
- BORTOLOZZO, F. P.; BERNARDI, M. L.; BENNEMANN, P. E.; WENTZ, I. V. O. Inseminação artificial em suínos. *In*: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª ed. São Paulo: Roca. 395p. 2008.
- CELEGHINI, E.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, n.2-4, p.119-31, 2008.
- CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; MARLÉN, F. et al. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). **Revista Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 19, p.1 13-125, 2008.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.
- CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D. et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 54, p. 27-35, 2007.
- CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome: **FAO**, 1991. 222p.
- CORTEEL, J. M. Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 14, p. 741-745, 1974.
- COUTO, F. A. A. Dimensionamento do mercado de carne ovina e caprina no Brasil. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 2003. p. 443-449.
- COSTA, R. G., ALMEIDA, C. C.; PIMENTA FILHO, E. C. et al. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do estado da Paraíba. Brasil. **Archives de Zootecnia**, v. 57, n. 218, p. 195-205, 2008.

- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER J.F.; AURELL WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v. 242, p. 1-10, 1987.
- CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KAN, R. Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Molecular Reproduction Development**, v. 37, p. 345-362, 1994.
- CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. ED.4, Rio de Janeiro: Elsevier, 710p, 2008.
- DIAS, J. C. O. **Adição de Ringer Lactato, Citrato de Sódio 2,92% e solução Tris em sêmen caprino**. 2010. 70f. Dissertação - (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2010.
- DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841, 1997.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Frozen Storage of Semen**. In: SALAMON'S ARTIFICIAL INSEMINATION OF SHEEP AND GOATS. Wellington: Butterworths, p. 122-141, 1987.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras**. Zaragoza: Editora Acribia, 1990, 192 p.
- FARSHAD, A.; AKHONDZADEH, S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 21, p. 1721-1727, 2008.
- FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.
- FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.
- GARCIA, V. T.; TRAVASSOS, A. E. R. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 81-88, 2012.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 447-454, 2004.
- GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492- 504, 2005.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. ED.7, São Paulo: Manole, 513p. 2004.
- HOLANDA JUNIOR, E. V.; MEDEIROS, H. R.; BERETTA, H. L. et al. Custo de produção de leite de cabra na região Nordeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA; CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Associação Brasileira de Zootecnia: Embrapa Caprinos; 2008. Disponível em:

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142599/1/CNPC-2008-Custo.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

HOLT, W. V. Basic aspects on frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

IBGE. Instituto de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE – **Levantamento sistemático da produção pecuária 2009**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 jun. 2017.

IBGE. Instituto de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE - **Levantamento sistemático da produção pecuária 2012**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=CA&z=t&o=24>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Levantamento sistemático da produção pecuária 2016**. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias>>. Acesso em: 13 março 2018.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104 p. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1998.

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

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATELLIER, F. Effect of native phosphor caseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 867- 877, 2003.

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: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v. 2, p. 433. 1991.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p. 1289–1297, 2009.

MAIA, M. S.; GOMES, J. T.; SILVA, J. G. M. et al. **Sistema de Produção de Caprino Leiteiro para a Agricultura Familiar**. Natal: EMPARN, p. 57, 2010.

MORTIMER, S. T, MAXWELL, W. M. C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 285-291, 2004.

MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

NAING, S. W.; WAHID, H.; MOHD AZAM, K. et al. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1, p. 23-28, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos e Glicobiologia. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 7, p. 243-280.

- NEVES, M. M. **Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus Domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino.** 2009. 116p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2009.
- NOGUEIRA FILHO, A.; FIGUEIREDO JÚNIOR, C. A.; YAMAMOTO, A. **Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos na área de atuação do BNB.** Banco do Nordeste do Brasil. n. 27, 128, p. 2010.
- O'CONNELL, M.; Mc CLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 704-709, 2002.
- ORTEGA, A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GÓMEZ, J. J. H.; OLIVARES-CORICHI, I. M. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. **Interciência**, v. 28, p. 699-704, 2003.
- PAPA, F. O.; CRESPILO, A. M.; FREITAS DELLA AQUA, C. P.; DELLA AQUA JR, J. A. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. Biotecnologia da reprodução em bovinos, *In: 3º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO APLICADA.* 2008. Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2008.
- PEGG DE. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproduction Medicine**, v. 20, n. 1, p. 05-14, 2002.
- PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility na cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of Bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 36-45, 2004.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- SALAMONS, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B. et al. Effect of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 316-323, 2010.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage is mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, R. O. C. **Efeito da ação de antioxidantes enzimáticos na criopreservação de sêmen caprino.** 2011. 84f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOUZA, W. H. O Agronegócio Da Caprinocultura De Corte No Brasil. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 51-58, 2007.

SETCHELL, B. P.; BROOKS, D. E. Anatomy, vascular, innervation and fluids of the male reproduction tract In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, New York, p. 753-836, 1988.

STORNELLI, M. C.; TITTARELLI, C. M.; SAVIGNONE, C. A.; STORNELLI, M. A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinary**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

TRALDI, A. S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. *In*: III FEIRA INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2006.

VARAGO, F. C.; MOUSTACAS, V. S.; CRUZ, B. C.; LAGARES, M. A. et al. Biotécnicas da Reprodução Aplicadas a Pequenos Ruminantes. *In*: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Minas Gerias, 2009.

VASCONCELOS FILHO, W. F. **Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino**. Pós-Graduação em Zootecnia (Dissertação). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

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

XAVIER, M. N.; MOUSTACAS, V. S.; CARVALHO JÚNIOR, C. A. Avaliação de diferentes antibióticos na inibição do crescimento de *Brucella ovis* em sêmen ovino congelado. *In*: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2009.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-585, 2000.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico foi elaborado de acordo com as normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Anexo A).

1 **Avaliação do efeito das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal**
2 **na criopreservação de sêmen caprino**

3
4 *[Evaluation of the effect of cryoprotectant combinations and seminal plasma removal on*
5 *cryopreservation of goat semen]*

6
7 A.F. Queiros^{1*}, C.F.A. Farias^{1,2}, A.S. Rique², A.L.P. Tork², M.M.P. Guerra³, S.V. Silva^{1,2}

8 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB

9 ²Centro de Biotecnologia - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

10 ³Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

11 *aline.queiros@hotmail.com

12
13 **RESUMO**

14 Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes crioprotetores e da centrifugação seminal sobre os
15 parâmetros de cinética e integridade das membranas do sêmen caprino criopreservado. Foram
16 utilizados quatro reprodutores caprinos, submetidos a colheita de sêmen por vagina artificial.
17 Após colheita e aprovação do sêmen, seis *pools* foram formados, cada *pool* fracionado em
18 oito alíquotas. Quatro alíquotas foram submetidas à remoção do plasma por centrifugação
19 (1200g/10min) e posteriormente diluídas; as restantes quatro alíquotas foram diluídas sem
20 remoção do plasma seminal nos diluidores Tris-Gema padrão (GP), Leite padrão (LP), Tris-
21 Gema teste (GT) e Leite teste (LT). Após diluição foram envasadas em palhetas (0,25 mL),
22 congeladas e armazenadas a -196 °C. As amostras foram descongeladas (37 °C/30s) e
23 avaliadas imediatamente e duas horas pós-descongelação quanto à cinética e integridade de
24 membranas plasmática e mitocondrial. Houve diferença ($P < 0,05$) entre os diluidores e tempo
25 para manutenção da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e potencial
26 mitocondrial entre os grupos centrifugado e não-centrifugado. Conclui-se que a centrifugação
27 para remoção do plasma seminal afeta positivamente os parâmetros de avaliação seminal e
28 diluidor à base de gema é mais eficiente diante das alterações de criopreservação, preservando
29 as características desejáveis após criopreservação do sêmen caprino.

30 Palavras-chave: Centrifugação; congelação; espermatozoide, fosfolipase A.

31
32 **ABSTRACT**

33 The objective of this study was to evaluate the effect of different cryoprotectants and seminal
34 centrifugation on the kinetic and integrity parameters of cryopreserved goat semen
35 membranes. Four male goats were used, submitted to the collection of semen by artificial

1 vagina. After collection and approval of semen, six pools were formed, each pool fractionated
2 into eight aliquots. Four aliquots were subjected to plasma removal by centrifugation (1200g /
3 10min) and subsequently diluted; the remaining four aliquots were diluted without seminal
4 plasma in standard Tris-Yolk egg (SG), Standard Milk (SM), Tris- Yolk egg test (GT) and
5 Milk Test (MT) diluents. After dilution they were packed into straws (0.25 mL), frozen and
6 stored at -196 ° C. Samples were thawed (37 ° C / 30s) and evaluated immediately and two
7 hours post-thawing for kinetics and integrity of plasma and mitochondrial membranes. There
8 was a difference (P <0.05) between the diluents and time to maintain spermatic kinetics,
9 plasma membrane integrity and mitochondrial potential between the centrifuged and non-
10 centrifuged groups. It can be concluded that centrifugation for removal of seminal plasma
11 positively affects the parameters of seminal evaluation and diluters based on yolk are more
12 efficient according to the cryopreservation alterations, preserving the desirable characteristics
13 after cryopreservation of goat semen.

14 Keywords: Centrifugation; freezing; spermatozoa, phospholipase A.

15

16 **INTRODUÇÃO**

17 A criopreservação associada à inseminação artificial (IA) são técnicas que auxiliam os
18 programas de melhoramento genético. No entanto, apesar das conquistas alcançadas no
19 campo da biotecnologia, a quantidade de células lesadas e mortas em relação ao sêmen fresco
20 aumenta substancialmente, não obstante das técnicas de congelação e descongelação
21 utilizadas (Ortega et al., 2003) e da espécie trabalhada.

22 Para que a fertilização ocorra é indispensável que os espermatozoides sejam dotados
23 de motilidade, potencial mitocondrial, integridade de membranas e núcleo celular fortemente
24 condensado (Graham; Mocé, 2005). Alterações a estas estruturas podem acarretar em
25 prejuízos para a fertilidade celular.

26 A qualidade dos diluidores crioprotetores representa um dos principais fatores
27 relacionados à manutenção da viabilidade dos espermatozoides criopreservados e exerce
28 influência sobre a qualidade e fertilidade das amostras congeladas (Papa et al., 2008). A gema
29 de ovo e o leite desnatado são rotineiramente utilizados nos diluidores seminais pelo fato de
30 protegerem as células durante as etapas de congelação e descongelação, atuando
31 principalmente sobre a membrana plasmática dos espermatozoides (Purdy, 2006). Contudo,
32 devido às interações das fosfolipases do sêmen caprino com algumas substâncias presentes na
33 gema de ovo e no leite que provocam efeitos nocivos aos espermatozoides, recomenda-se a
34 retirada do plasma seminal (Leboeuf et al., 2000).

1 Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação de sêmen
2 animal, estão os açúcares simples como a glicose e frutose, que além de desempenharem
3 papel nutritivo fornecendo energia necessária para a motilidade espermática, exercem função
4 crioprotetora (Purdy, 2006).

5 Segundo Celeghini et al. (2008), um melhor conhecimento quanto aos mecanismos de
6 atuação dos diluidores na célula espermática e a utilização de técnicas que apresentem grande
7 acurácia, maior repetibilidade e objetividade na avaliação dos efeitos da criopreservação sobre
8 os espermatozoides seria imprescindível para auxiliar no desenvolvimento do diluidor ideal.
9 Desse modo, grande ênfase vem sendo dada às técnicas de avaliação automatizada da
10 motilidade (CASA) e de marcações específicas com o uso de sondas fluorescentes, pela
11 possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides
12 (Arruda et al., 2007), bem como para a atuação do plasma seminal na célula espermática.

13 Diante do exposto, é presumível que a partir da avaliação dos efeitos da
14 criopreservação sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial pelas técnicas de
15 microscopia de epifluorescência e sistema computadorizado de análise espermática e da
16 centrifugação do sêmen, seja possível determinar a composição de diluidores e técnicas
17 eficientes para a criopreservação do sêmen caprino.

18

19 **METODOLOGIA**

20 O experimento foi desenvolvido em parceria com os laboratórios de Reprodução
21 Animal do Centro de Ciências Veterinária (UFPB/Areia), Biotecnologia em Reprodução
22 Animal (LABRA/CBiotec/UFPB), Andrologia (ANDROLAB/Departamento de Medicina
23 Veterinária/UFRPE/Recife) e de Reprodução da Universidade Federal da Paraíba
24 (CCHSA/UFPB), localizado na cidade de Bananeiras/PB (-6.75105 Latitude, -35.6334
25 longitude; 6° 45' 4" Sul, 35° 38' 0" Oeste), após aprovação da Comissão de Ética no Uso de
26 Animais (Licença nº 095/2017/CEUA-UFPB).

27 Foram utilizados quatro reprodutores, dois da raça Saanen e dois Alpinos, com dois a
28 quatro anos de idade e pesando em média 50 kg. Os animais foram mantidos em regime
29 intensivo, alimentados com capim elefante (*Pennisetum purpureum*), ração composta por soja,
30 milho, farelo de trigo e pasta de algodão e água *ad libitum*. A colheita de sêmen foi realizada
31 com vagina artificial, com o auxílio de uma fêmea em estro como manequim. As colheitas
32 foram realizadas três vezes por semana, durante duas semanas (n=6).

33 A princípio, cada reprodutor foi avaliado separadamente para os parâmetros
34 microscópicos, e após aprovado (turbilhonamento ≥ 3 ; motilidade $\geq 70\%$) foi realizada a

1 formação do *pool* e uma nova avaliação da motilidade e vigor. Foram realizadas avaliações de
2 integridade de membrana plasmática empregando o teste de dupla coloração com eosina-
3 nigrosina e funcionalidade da membrana plasmática através do teste hiposmótico (HOST)
4 (CBRA, 2013). A concentração foi obtida através de contagem em câmara de Neubauer em
5 diluição de 1:400 em solução de formol-salina usando microscópio (Motic BA300).

6 Quatro diferentes diluidores foram confeccionados nesse estudo. O diluidor Tris Gema
7 padrão (3,605 g de Tris; 2,024 g de Ácido cítrico; 1,488 g de Frutose; 100 mL de Água
8 destilada; 20% de Gema de ovo; 3 mg de Antibiótico (Pentabiótico Agrovét®); 5% Glicerol;
9 pH 6,8), conforme metodologia de Hafez e Hafez (2004); diluidor Leite padrão (10 g Leite em
10 pó desnatado; 194 mg de Glicose; 100 mL de água destilada; 3 mg de Antibiótico
11 (Pentabiótico Agrovét®); 7% de Glicerol; pH 6,8) segundo metodologia de Barros (2010); os
12 diluidores teste: Tris Gema Teste (3,605 g de Tris; 2,024 g de Ácido cítrico; 0,5 g de Glicose;
13 100 mL de água destilada; 20% de Gema de ovo; 3 mg de Antibiótico (Pentabiótico Agrovét
14 ®); 5% de Glicerol; pH 6,8) e Leite Teste (10 mg de Leite em pó desnatado; 578 mg de
15 Frutose; 100 mL de água destilada; 3 mg de Antibiótico (Pentabiótico Agrovét®); 7% de
16 Glicerol; pH 6,8). Para cada diluidor, as substâncias foram homogeneizadas em agitador
17 magnético. Os diluidores a base de leite submetidos ao banho-maria a 90 °C durante 10
18 minutos. Os grupos foram fracionados em tubos falcons e congelados (-20 °C).

19 O *pool* seminal foi fracionado em oito alíquotas de igual volume, quatro amostras foram
20 diretamente diluídas sem remoção do plasma seminal - NC (Não centrifugado) nos diferentes
21 diluidores. As outras quatro amostras foram submetidas ao processo de remoção do plasma -
22 C (Centrifugado) por dupla centrifugação (1200g/10min) com solução fisiológica (0,9%
23 NaCl, pH 6,0), na proporção 1:10, onde o sobrenadante foi descartado e o sedimento
24 ressuspensão nos diferentes diluidores.

25 Ao final do processo de diluição, oito grupos experimentais foram formados: LP-C
26 (leite padrão + glicose centrifugado); GP-C (gema padrão + frutose centrifugado); LT-C (leite
27 teste + frutose centrifugado); GT-C (gema teste + glicose centrifugado); LP-NC (leite padrão
28 + glicose não centrifugado); GP-NC (gema padrão + frutose não centrifugado); LT-NC (leite
29 teste + frutose não centrifugado); GT-NC (gema teste + glicose não centrifugado). Para cada
30 grupo experimental quatro palhetas de 0,25 µL foram envasadas, na dose inseminante de
31 100×10^6 espermatozoides por palheta, como preconizado pelo Colégio Brasileiro de
32 Reprodução Animal, totalizando 32 palhetas para cada *pool*.

33 Após envase, as palhetas foram refrigeradas em geladeira com temperatura interna
34 estabilizada em 5 °C, utilizando curva de refrigeração caracterizada por Bispo et al. (2011),

1 perfazendo o tempo total de três horas e trinta minutos de refrigeração, como caracterizado
2 por Jiménez-Rabadán et al. (2013). Em seguida, as palhetas foram dispostas horizontalmente
3 em vapor de nitrogênio líquido (N₂) a 5 cm da lâmina líquida, por 20 minutos, dentro de uma
4 caixa térmica de isopor, posteriormente imersas no N₂ e acondicionadas em botijão criogênico
5 a -196 °C, até o momento da descongelação.

6 Após descongelação (37 °C/30 s) e transferidas para microtubos de 1,5 mL, alíquotas
7 dos grupos experimentais foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos, integridade de
8 membranas plasmática (iMT) e potencial de membrana mitocondrial (PM) nos tempos de 0 e
9 2 horas pós-descongelação.

10 A avaliação da cinética espermática foi realizada através do sistema computadorizado
11 de análise espermática – CASA (SCATM; Microptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha).
12 Uma alíquota (10 µL) da amostra foi diluída em 100 µL de PBS e colocada em lâmina pré-
13 aquecida (37 °C), coberta com lamínula e avaliada através da microscopia de contraste de fase
14 (Eclipse 50i, Nikon, Japão) acoplado a câmera de vídeo com magnificação de 100x, a partir
15 de imagens digitalizadas e analisadas por software. Para cada amostra seis campos aleatórios
16 e não consecutivos foram capturados, onde cada célula teve sua trajetória reconstruída.

17 As seguintes variáveis foram avaliadas: motilidade total (MT; %), motilidade
18 progressiva (MP; %), linearidade (LIN; %), velocidade curvilinear (VCL; µm/s), velocidade
19 em linha reta (VSL; µm/s) e velocidade média do percurso (VAP; µm/s). Os valores de
20 CASA foram mensurados com as seguintes configurações: temperatura de 37 °C;
21 magnificação de 100x; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área de cabeça, 20 a
22 70 µm²; VAP: lentos 10 µ/s < médios 45 µ/s < rápidos 75 µ/s; progressividade, 80% STR,
23 50% LIN (Verstegen et al., 2002).

24 A integridade de membrana plasmática foi avaliada pelo método de dupla coloração
25 utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA; 0,46 mg/mL em DMSO)
26 e iodeto de propídio (PI; 0,5 mg/mL em PBS). Foram adicionados 150 µL de PBS + 50 µL da
27 amostra, que foram coradas com 5,0 µL de CFDA e 5,0 µL de PI, incubada por cinco minutos
28 a temperatura ambiente (25 °C) e posteriormente adicionados 5,0 µL de paraformaldeído. Um
29 total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss,
30 Göttingen, Alemanha) usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de emissão de 580-
31 630 nm.

32 Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o monômero
33 Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimi-dazolil carbocianina (JC-1; 0,15 mM
34 em DMSO). Para cada tratamento, uma alíquota (50 µL) da amostra foi corada com 5,0 µL de

1 JC-1, incubada por cinco minutos e adicionados 5,0 μ L de paraformoldeído. Ao total, 200
2 espermatozoides foram avaliados usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de
3 emissão de 580-630 nm.

4 Os dados de cinética, integridade e funcionalidade de membrana plasmática e
5 potencial mitocondrial foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Sminorv. Em sequência, os
6 dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey. Para
7 avaliação entre os tempos 0 e 2h de descongelação, o test t foi realizado. Todos os testes
8 consideraram significância de 5%.

9

10 RESULTADOS

11 Para os valores MT (Tab. 1), os grupos LPNC e LTNC diferiram do grupo GPNC
12 imediatamente pós-descongelação (0h); os grupos LPNC e LTNC obtiveram os menores
13 percentuais de MT. Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre o grupo LPC e os grupos
14 GPC e GTC duas horas pós-descongelação; os grupos centrifugados GP e GT mantiveram
15 maior motilidade. Levando em consideração as amostras viáveis, o leite também manteve a
16 motilidade. Com relação aos tempos de avaliação, foi constatada diferença ($p < 0,05$) entre os
17 grupos LPC, LTC, GPNC e GTNC, com expressiva redução da MT.

18 Para o parâmetro de MP (Tab. 1), houve diferença ($p < 0,05$) para os grupos GPC e
19 LTC, que diferiram dos grupos LPNC e LTNC, pós-descongelação (0h). O percentual de MT
20 dos grupos LP e LT não centrifugados apresentam-se menores. Os grupos GPC e GTC
21 diferiram dos grupos LPC, GPNC e GTNC duas horas após descongelação ($p < 0,05$). Ao
22 considerar o tempo de avaliação, notou-se diferença ($p < 0,05$) entre os grupos LPC, GPC,
23 LTC, GPNC e GTNC, onde os tratamentos se comportaram de forma semelhante a MT, com
24 redução superior a 50%. Logo, a presença de gema na composição do diluidor e a

Tabela 1. Percentual de motilidade total e progressiva de células espermáticas caprinas submetidas à congelamento com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelamento

	Motilidade Total (%)		Motilidade Progressiva (%)	
	0h	2h	0h	2h
LPC	32,62±11,77 ^{ab*}	8,05±4,37 ^{b*}	16,89±0,06 ^{ab*}	2,10±0,02 ^{b*}
GPC	40,60±7,03 ^{ab}	34,00±6,49 ^a	24,29±0,06 ^{a*}	13,10±0,08 ^{a*}
LTC	41,63±11,44 ^{ab*}	17,13±8,65 ^{ab*}	22,30±0,09 ^{a*}	6,00±0,04 ^{ab*}
GTC	32,27±18,61 ^{ab}	33,20±25,16 ^a	18,10±0,13 ^{ab}	12,70±0,11 ^a
LPNC	22,38±9,12 ^b	16,6±6,00 ^{ab}	6,90±0,04 ^b	5,30±0,03 ^{ab}
GPNC	52,58±10,26 ^{a*}	11,8±10,25 ^{ab*}	16,56±0,05 ^{ab*}	2,20±0,03 ^{b*}
LTNC	21,53±11,33 ^b	17,8±8,20 ^{ab}	6,10±0,06 ^b	6,60±0,04 ^{ab}
GTNC	42,67±13,02 ^{ab*}	17,2±15,28 ^{ab*}	14,90±0,07 ^{ab*}	2,59±0,02 ^{b*}

LPC= Grupo controle leite padrão centrifugado; GPC= Grupo controle gema padrão centrifugado; LTC= Grupo leite teste centrifugado (Leite+frutose); GTC= Grupo gema teste centrifugado (Gema+glicose); LPNC= Grupo controle leite padrão não-centrifugado; GPNC= Grupo controle gema padrão não-centrifugado; LTNC= Grupo leite teste não-centrifugado (Leite+frutose); GTNC= Grupo gema teste não-centrifugado (Gema+glicose). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos de avaliação. Asteriscos na mesma linha indicam diferença entre os tempos.

1 centrifugação atuam de forma benéfica na manutenção da MT e MP.

2 Os resultados para os parâmetros de VAP, VSL e VCL foram inferiores ($p<0,05$)
3 principalmente entre os grupos LPNC e LTNC quando comparados aos grupos LPC, GPC,
4 LTC e GTC no momento da descongelção (Tab. 2). Independentemente do diluidor
5 utilizado, não foi constatada diferença ($p<0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros de
6 VCL e VAP na avaliação após duas horas de descongelção, diferindo apenas para o
7 parâmetro de VSL, onde os grupos LPC e LTNC diferiram do GTNC.

8 Foi observada correlação entre diluidor e tempo ($p<0,05$), com redução da velocidade
9 dos espermatozoides do grupo LPC em 66,6%, 58% e 59,2% nos valores de VCL; VSL e
10 VAP, respectivamente. No grupo LTC os valores foram reduzidos em 68% de VCL e 64,3%
11 de VAP; o grupo GPNC decresceu em 53,4% do VCL e GTNC em 45,3% do VSL após duas
12 horas de descongelção.

Tabela 2. Valores absolutos dos parâmetros de velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média (VAP) de espermatozoides caprinos criopreservados em diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelção

	VCL ($\mu\text{m/s}$)		VSL ($\mu\text{m/s}$)		VAP ($\mu\text{m/s}$)	
	0h	2h	0h	2h	0h	2h
LPC	106,3 \pm 11,1 ^{a*}	70,9 \pm 13,4*	81,2 \pm 11,0 ^{a*}	47,1 \pm 12,1 ^{a*}	99,1 \pm 11,4 ^{a*}	58,7 \pm 12,2*
GPC	95,2 \pm 21,9 ^a	83,0 \pm 27,6	70,0 \pm 20,2 ^a	49,9 \pm 21,1 ^{ab}	86,1 \pm 23,3 ^{ab}	68,2 \pm 26,0
LTC	100,8 \pm 16,4 ^{a*}	68,7 \pm 16,8*	70,8 \pm 17,3 ^{ab}	47,5 \pm 17,3 ^{ab}	87,7 \pm 20,6 ^{ab*}	56,4 \pm 17,9*
GTC	93,5 \pm 21,8 ^{ab}	74,3 \pm 27,5	72,5 \pm 22,6 ^{ab}	44,2 \pm 12,7 ^{ab}	84 \pm 22,8 ^{ab}	61,8 \pm 23,5
LPNC	62,7 \pm 18,8 ^b	58,3 \pm 12,7	43,8 \pm 11,1 ^b	43,4 \pm 11,6 ^{ab}	56 \pm 16,2 ^b	52,2 \pm 12,2
GPNC	103,5 \pm 10,7 ^{a*}	55,3 \pm 44,4*	46,8 \pm 10,6 ^b	23,0 \pm 19,3 ^{ab}	69,3 \pm 12,0 ^{ab}	35,7 \pm 29,5
LTNC	69,8 \pm 16,7 ^b	75,1 \pm 11,5	43,9 \pm 14,0 ^b	50,3 \pm 9,6 ^a	59,6 \pm 6,2 ^b	65,2 \pm 8,2
GTNC	89,1 \pm 12,3 ^{ab}	50,0 \pm 39,9	46,3 \pm 14,6 ^{b*}	21,0 \pm 16,4 ^{b*}	62,1 \pm 17,7 ^b	31,4 \pm 24,8

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos de avaliação. Asteriscos na mesma linha indicam diferença entre os tempos.

13 A LIN dos espermatozoides dos grupos GP e GT não centrifugados diferiram ($p<0,05$)
14 dos demais grupos nos períodos 0 e 2 horas (Tab. 3). O mesmo ocorreu para STR, onde os
15 grupos GPNC, LTNC e GTNC obtiveram valores inferiores em relação aos demais grupos no
16 tempo de 0h. O WOB apresentou os mesmos padrões de LIN e STR, com valores inferiores
17 para os espermatozoides criopreservados nos diluidores GPNC e GTNC. Foi observado
18 também, melhora nos padrões de velocidade nos grupos contendo frutose em sua composição.
19 Na relação diluidor *versus* tempo, houve diferença ($P<0,05$) na LIN apenas para o grupo GTC
20 e no WOB para o grupo LPC.

21

Tabela 3. Valores percentuais dos parâmetros de linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação (WOB) de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação

	LIN (%)		STR (%)		WOB (%)	
	0h	2h	0h	2h	0h	2h
LPC	76,3±6,4 ^a	65,8±9,7 ^a	81,9±6,1 ^a	79,4±7,3	93,1±1,5 ^{a*}	82,9±9,0 ^{ab*}
GPC	77,2±5,9 ^a	61,8±17,6 ^{ab}	85,9±3 ^a	74,9±16,3	89,7±4,6 ^a	81,6±8,8 ^{ab}
LTC	69,5±5,9 ^a	68,2±11,8 ^a	80,6±2,1 ^a	83,6±7,2	86,2±6,8 ^a	81,1±8,9 ^{ab}
GTC	76,4±6,5 ^{a*}	62,0±11,2 ^{ab*}	85,4±4,0 ^a	74,5±11,4	89,3±4,4 ^a	83,1±6,8 ^{ab}
LPNC	70,8±5,7 ^a	74,1±5,9 ^a	79,0±4,7 ^a	82,7±4,2	89,6±3,5 ^a	89,5±3,8 ^a
GPNC	45,0±10,5 ^b	35,3±18,1 ^b	66,6±6,5 ^b	52,5±26,2	67,0±10,2 ^b	56,5±29,9 ^b
LTNC	62,7±8,6 ^a	67,3±10,9 ^a	73,3±6,3 ^b	77,0±9,5	85,3±6,5 ^a	87,1±5,2 ^a
GTNC	51,2±10,8 ^b	41,7±26,3 ^b	74,0±4,5 ^b	61,0±33,2	68,7±11,5 ^b	55,6±28,6 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos de avaliação. Asteriscos na mesma linha indicam diferença entre os tempos.

1 Observou-se que os grupos GPNC e GTNC apresentam valores superiores ($p < 0,05$) de
 2 ALH; de forma semelhante acontece com a BCF onde os valores para GPNC e GTNC
 3 diferem ($p < 0,05$) dos demais grupos experimentais na avaliação imediata (0h). Na avaliação
 4 duas horas pós-descongelação, houve diferença ($p < 0,05$) apenas para o BCF entre os grupos
 5 LPC e GPC, sendo o grupo GPC superior. Referente ao tempo foi observado diferença
 6 ($p < 0,05$) na BCF entre os grupos LPC, GTC e GPNC (Tab. 4).

Tabela 4. Valores absolutos dos parâmetros de amplitude lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar de espermatozoides (BCF) caprinos analisados nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação

	ALH (μm)		BCF (Hz)	
	0h	2h	0h	2h
LPC	2,0±0,1 ^b	1,3±0,9	7,4±0,7 ^{b*}	4,6±2,5 ^{b*}
GPC	2,2±0,3 ^b	2,2±0,3	8,4±0,3 ^b	9,2±1,1 ^a
LTC	2,4±0,4 ^b	2,1±0,2	8,3±0,2 ^b	8,6±1,9 ^{ab}
GTC	2,4±0,4 ^b	1,9±0,8	8,7±0,6 ^{b*}	7,1±1,8 ^{ab*}
LPNC	2,0±0,3 ^b	1,9±0,4	7,4±0,4 ^b	7,3±0,9 ^{ab}
GPNC	3,6±0,6 ^a	1,7±1,8	11,3±2,5 ^{a*}	5,3±4,6 ^{ab*}
LTNC	2,1±0,5 ^b	1,9±0,7	7,0±0,9 ^b	7,7±1,7 ^{ab}
GTNC	3,1±0,6 ^a	2,1±1,7	10,0±1,7 ^a	7,9±6,3 ^{ab}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos de avaliação. Asteriscos na mesma linha indicam diferença entre os tempos.

7 As avaliações subjetivas de iMP (Tab. 5) evidenciaram que houve diferença ($p < 0,05$)
 8 entre os diluidores, sendo os grupos GPNC e GTNC superiores em relação aos grupos LPC,
 9 LPNC e LTNC, que apresentaram baixa quantidade de células íntegras na análise imediata
 10 (0h). Não houve diferença ($p > 0,05$) nas avaliações de integridade avaliadas pelas sondas
 11 fluorescentes.

Tabela 5. Percentual de integridade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação

	Eosina/Nigrosina (%)		Sondas Fluorescentes (%)	
	0h	2h	0h	2h
LPC	27,9±16,2 ^{b*}	17,3±13,1*	37,5±18,2	36,1±16,1
GPC	43,0±18,1 ^{ab}	32,9±15,6	46,5±10,0	45,5±15,3
LTC	43,7±9,4 ^{ab*}	20,7±15,7*	53,4±11,6	49,6±15,5
GTC	45,5±9,1 ^{ab}	33,5±16,2	33,6±14,2	30,9±13,3
LPNC	33,9±5,9 ^b	26,6±9,9	36,6±12,3	31,1±9,8
GPNC	64,0±10,6 ^{a*}	31,4±23,6*	48,5±9,9	27,3±23,1
LTNC	28,5±7,9 ^{b*}	17,7±7,3*	35,8±11,2	35,5±6,8
GTNC	58,5±13,9 ^{a*}	30,7±15,1*	43,0±8,1	28,0±23,4

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos de avaliação. Asteriscos na mesma linha indicam diferença entre os tempos.

1

2

3

4

5

6

Para avaliação do PM (Tab. 6) é possível verificar que não houve interferência neste parâmetro na avaliação imediata, no entanto, duas horas pós-descongelação é possível observar valores inferiores ($p < 0,05$) para os grupos GPNC e GTNC, que diferem dos grupos GPC, GTC e LPNC. Não foi observada alteração da funcionalidade da membrana plasmática, independentemente do grupo testado e do tempo de avaliação.

Tabela 6. Percentual de alto potencial mitocondrial e funcionalidade da membrana plasmática de células espermáticas caprinas submetidas à congelação com diferentes diluidores e analisadas nos tempos 0 e 2 horas pós-descongelação

	Potencial Mitocondrial (%)		Funcionalidade (%)	
	0h	2h	0h	2h
LPC	39,0±18,4	29,5±24,3 ^{ab}	37,5±18,2	36,1±16,1
GPC	55,0±6,6	37,9±26,6 ^a	46,5±10,0	45,5±15,3
LTC	38,9±15,4	24,5±25,0 ^{ab}	53,4±11,6	49,6±15,5
GTC	53,8±20,4	44,4±24,3 ^a	33,6±14,2	30,9±13,3
LPNC	31,3±18,2	47,9±13,7 ^a	36,6±12,3	31,1±9,8
GPNC	49,7±28,0*	0,0±0,0 ^{b*}	48,5±9,9	27,3±23,1
LTNC	28,9±19,6	33,1±13,8 ^{ab}	35,8±11,2	35,5±6,8
GTNC	37±23,3*	1,1±2,8 ^{b*}	43,0±8,1	28,0±23,4

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos de avaliação. Asteriscos na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação ($P < 0,05$)

7

8

9

10

11

12

Os valores referentes à viscosidade dos diferentes diluidores estão expressos na forma de média e desvio padrão (Tab. 7). A viscosidade diferiu entre os grupos experimentais, todavia os diluidores GP e GT mostram-se mais viscosos ($p < 0,05$) que o grupo LT, obtendo maior viscosidade a 10 °C. À temperatura de 37 °C a viscosidade dos GP e GT foram maiores que os grupos LP e LT.

Tabela 7. Valores da viscosidade dos diluidores padrão e testes (Tris-gema e leite) nas temperaturas de 10 °C e 37 °C

	10 °C (cP)	37 °C (cP)
LP	3,19±0,40 ^{ab}	1,12±0,15 ^{c*}
GP	3,67±0,18 ^{a*}	1,60±0,11 ^{a*}
LT	2,55±0,12 ^{c*}	1,19±0,11 ^{c*}
GT	2,91±0,22 ^{b*}	1,41±0,10 ^{b*}

cP: centipoise; LP: diluidor leite padrão; GP: diluidor tris-gema padrão; LT: diluidor leite teste; GT: diluidor gema teste. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos de avaliação. Asteriscos na mesma linha indicam diferença entre os tempos (P<0,05).

1

2 DISCUSSÃO

3 Nesse experimento, o percentual de motilidade diferiu conforme diluidor utilizado,
 4 tempo de avaliação e centrifugação. Para os parâmetros de MT, todos os grupos centrifugados
 5 e os grupos contendo gema não centrifugados mantiveram-se acima dos padrões considerados
 6 aceitáveis para sêmen congelado, ou seja, acima de 30% (CBRA, 2013), embora seja
 7 perceptível maior manutenção da motilidade para os grupos centrifugados e diluídos em gema
 8 de ovo. Esta observação pode indicar que os substratos presentes nos crioprotetores atuaram
 9 de forma diferente sobre a célula espermática, em especial sobre as estruturas envolvidas na
 10 motilidade celular, como integridade das membranas, estruturas flagelares e função
 11 mitocondrial (Celeghini et al., 2008).

12 Para a MP, houve redução na maioria dos grupos experimentais, com resultados
 13 inferiores para os grupos não centrifugados, mostrando que a não centrifugação influenciou
 14 negativamente a motilidade e as velocidades espermáticas, com ênfase para os grupos com
 15 leite em sua composição. Estes grupos apresentaram maior interação com o plasma seminal,
 16 refletindo em diminuição dos valores de VCL, VSL e VAP dos espermatozoides nas
 17 avaliações imediatas, no entanto, o percentual dos parâmetros de velocidade LIN, STR e
 18 WOB demonstraram que o leite conseguiu manter esses parâmetros por um maior período de
 19 tempo.

20 Este fato relaciona-se com a presença de enzimas características no sêmen caprino, as
 21 fosfolipases A, que interagem com a gema do ovo e o leite presente nos diluidores,
 22 produzindo substâncias que comprometem a viabilidade espermática (Pellicer-Rubio e
 23 Combarous, 1998). Sugere-se que essas enzimas interajam com o leite de modo mais
 24 intensificado durante o processo de criopreservação e hidrolise os triglicerídeos da membrana
 25 plasmática do espermatozoide e do leite desnatado, resultando no ácido oleico, um ácido
 26 graxo que é tóxico aos espermatozoides (Pellicer-Rubio et al., 1997), provocando redução
 27 brusca da velocidade espermática.

1 Esse efeito pode relacionar-se também com a alta concentração de cálcio presente no
2 leite, que pode ser responsável por promover maior atividade de fosfolipases A, visto que
3 estas enzimas são cálcio dependente e atuam aumentando a permeabilidade a íons da
4 membrana (Martins, 2006). No entanto, após estabilização das suas atividades biológicas, o
5 leite consegue atuar de forma eficiente na conservação dos espermatozoides. Esta adaptação
6 pode ser possível devido ao leite possuir certa capacidade tampão, ação bactericida e
7 carboidratos que seriam utilizados na atividade cinética (Cunha, 2002).

8 Modo dessemelhante ocorreu com o grupo centrifugado. Nas avaliações imediatas dos
9 diluidores contendo gema em sua composição, as velocidades apresentam-se mais baixas que os
10 diluidores a base de leite, embora, ainda na ausência do plasma, a gema consiga manter por mais
11 tempo a viabilidade dos parâmetros de velocidade.

12 De acordo com Aboagla e Terada (2004), a adição de gema de ovo aos diluentes para
13 o sêmen caprino aumenta a proporção de espermatozoides móveis recuperados pós-
14 descongelação, através da restauração dos fosfolípidios que confere maior estabilidade à
15 membrana plasmática, melhora os índices velocimétricos e mantém por mais tempo a
16 viabilidade da célula.

17 A capacitação é uma série de alterações que prepara o espermatozoide para ligar-se à
18 zona pelúcida do oócito, após este processo o espermatozoide passa a ser responsivo ao
19 estímulo que induz a reação acrossomal e desenvolve um padrão particular de motilidade
20 conhecido como hiperativação ou hipermotilidade (Luconi et al., 2005).

21 Mortimer et al. (1998) consideram que espermatozoides com linearidade < 50% são
22 considerados hiperativados. Para Robertson e colaboradores (1988), frequência de batimento
23 flagelar de 8,7Hz caracteriza a hiperativação. O presente trabalho encontrou valores
24 semelhantes com os apresentados por estes autores, LIN entre 45% e 51,1%, BCF entre 11,3
25 Hz e 10,0 Hz e ALH de 3,6 e 3,1 para GPNC e GTNC respectivamente, na avaliação
26 imediata, caracterizando processo de hiperativação precoce nos espermatozoides destes
27 grupos.

28 O efeito das fosfolipases comentadas anteriormente associado ao processo de
29 criopreservação desencadeia processos biológicos que podem ter levado a hiperativação
30 espermática nestes grupos, contudo, no sêmen caprino, além das fosfolipases, também
31 existem proteínas análogas às BSP (Bovine Seminal Plasma) que atuam diretamente na
32 capacitação espermática e podem ter potencializado esse efeito (Manjunath e Therien, 2002).

33 A afinidade dessas proteínas com o LDL da gema de ovo pode ter causado uma
34 interação dessas proteínas com o diluidor, reduzindo a quantidade de lipídios disponíveis para

1 exercer sua função na membrana espermática (Bergeron e Manjunath, 2006), bem como na
2 remoção deste esteroide da membrana espermática, apontando para uma possível
3 desestabilização que induziu o aumento da permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} e ao seu pH
4 intracelular (Villemure et al., 2003). O cálcio ativa diferentes enzimas, dentre elas as
5 fosfolipases A_2 , além de atuar como gatilho relacionado para a capacitação, reação
6 acrossômica, motilidade espermática hiperativada, entre outros (Suarez et al., 1993).

7 Esses dados sugerem que sem a centrifugação a gema pode interagir com as enzimas e
8 proteínas do plasma, impossibilitando que LDL sejam integradas à membrana celular,
9 desorganizando e tornando-a mais fluída, ativando o gatilho para o influxo de cálcio
10 intracelular, desencadeando a capacitação e reação acrossomal prematura.

11 Suarez e seus colaboradores (1991) permitem ainda que este dado seja observado por
12 um novo viés, de que a motilidade hiperativada represente um aumento da força do batimento
13 flagelar espermático em resposta ao aumento da viscosidade. Assim, a maior viscosidade dos
14 diluidores a base de gema (Tab. 7) corresponde a uma vantagem mecânica que confere ao
15 espermatozoide passagem facilitada através do fluído viscoso do oviduto e da zona pelúcida.

16 Após avaliação imediata (0h) das amostras marcadas com a associação das sondas
17 DCF e IP, não foi notada diferença no percentual de espermatozoides com membrana
18 plasmática íntegra. No entanto, os grupos a base de gema apresentaram maior número de
19 células íntegras. Essa proteção é resultado da ligação das LDL da gema de ovo com a
20 membrana plasmática, associado ao perfil osmótico do açúcar e ao padrão de viscosidade da
21 gema. À temperatura de 10 °C (Tab. 7), a gema se comporta aumentando sua viscosidade,
22 principalmente quando na presença da frutose, contribuindo para a estabilização da bicamada
23 lipídica quando a membrana inicia o processo de transição da fase fluída para o estado em gel.

24 Bergeron et al. (2007) acreditam que o efeito protetivo da gema com relação ao leite
25 seja potencializado por envolver lipídios ao invés de proteínas. Este fato pode ser confirmado
26 com as alterações na viscosidade a 37 °C, onde mesmo a temperatura corpórea a gema
27 mantém uma maior viscosidade, devido a sua grande quantidade de lipídios, fato este não
28 observado no leite desnatado utilizado nos diluidores, que é pobre em gorduras.

29 A redução na quantidade de células íntegras após duas horas de incubação, em
30 especial para os grupos gema, mostrou que existe uma diminuição na rigidez da membrana
31 plasmática, fato este compatível com a fertilização, já que é necessário que a célula desacople
32 e diminua sua integridade para realizar a reação acrossomal.

33 Foi observado que a produção de ATP se correlaciona positivamente com a
34 integridade de membranas e com a motilidade. O potencial mitocondrial dos diluidores a base

1 de gema em foram superiores no primeiro momento (Tab. 6), entretanto com redução brusca
2 duas horas após incubação nos grupos não centrifugados. No momento em que houve declínio
3 da integridade, o potencial mitocondrial também foi reduzido e conseqüentemente a
4 motilidade, em virtude desta ser dependente da sua produção energética. Nesse contexto,
5 sugere-se que os espermatozoides dos grupos GPNC e GTNC foram hiperativados
6 rapidamente, utilizando todo o seu potencial mitocondrial e/ou que a interação negativa do
7 plasma com a gema pode ter dificultado o mecanismo de consumo energético
8 independentemente do tipo de açúcar utilizado.

9 Essa redução durante a incubação, conforme Celeghini et al. (2008), também pode
10 estar relacionada à diminuição gradual da habilidade do espermatozoide em produzir ATP
11 através da respiração mitocondrial, como consequência dos efeitos tóxicos das espécies
12 reativas de oxigênio (ROS), comprometendo o potencial de membrana mitocondrial.

13

14 **CONCLUSÕES**

15 Apesar do leite desnatado ser o componente básico dos diluentes recomendados para o
16 uso rotineiro na preservação do sêmen de bode, o diluidor gema padrão e a retirada do plasma
17 seminal melhor preservam o sêmen caprino das alterações promovidas pela criopreservação,
18 mantendo as características desejáveis para a fertilidade pós-descongelação. Os diluidores à
19 base de leite mantém por maior período os índices velocimétricos da célula espermática,
20 embora não preservem a motilidade.

21

22 **REFERÊNCIAS**

- 23 ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of
24 cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1160-1172,
25 2004.
- 26 ARRUDA, P.R.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C. et al. Avaliação de sêmen fresco
27 e congelado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM
28 CAPRINOS E OVINOS. 1. 2007. Gravatá, PE. Anais... 2007. CD ROOM.
- 29 BARROS, M.S.R.M. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em diluente
30 acrescido de superóxido dismutase e catalase em diferentes concentrações. 2010. 69f. Tese
31 (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife,
32 2010.
- 33 BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of
34 sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Devel.*, v.73, n.10, p.1338-1344, 2006.

- 1 BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; *et al.* Milk caseins decrease the binding of
2 the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm
3 membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.*, v.77, p.120-126, 2007.
- 4 BISPO, C.A.S.; PUGLIESI, G.; PALHÃO, M.P.; *et al.* Características in vitro e fertilidade do
5 sêmen caprino armazenado a 5 °C por 24 horas utilizando duas concentrações de gema de ovo
6 no diluente. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.12, n.4, p.653-660, 2011.
- 7 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame Andrológico e
8 Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed. Belo Horizonte. 104 p. 2013
- 9 CELEGHINI, E.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.; *et al.* Effects that bovine sperm
10 cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin.
11 *Anim. Reprod. Sci.* v.104, n.2-4, p.119-31, 2008.
- 12 CUNHA, I.C.N. Criopreservação do sêmen de cães. 2002. 149f. Tese (Doutorado) -
13 Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2002.
- 14 GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*,
15 v.64, p.492- 504, 2005.
- 16 HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. ED.7, São Paulo: Manole, 513p. 2004.
- 17 JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; *et al.* Improved
18 cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation.
19 *Cryobiology.* v.67, p.251–257, 2013.
- 20 LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for
21 artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.113-141, 2000.
- 22 LUCONI, M.; PORAZZI, I.; FERRUZZI, P. *et al.* Tyrosine phosphorylation of the A Kinase
23 Anchoring Protein 3 (AKAP3) and soluble adenylate cyclase are involved in the increase of
24 human sperm motility. *Biol. Reprod.*, v.72, p.22-32, 2005.
- 25 MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in
26 sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.*,
27 v.53, p.109-119, 2002.
- 28 MARTINS, L.F.; PEREIRA, M.C.B., GUIMARÃES, J.D.; *et al.* Avaliação espermática e da
29 concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de
30 monta controlada *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.4, p.1653-1659, 2006.
- 31 MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation
32 and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reprod.*, v.13, p.2139 – 2146, 1998.

- 1 ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H.; OLIVARES-CORICHI, I.M. et al.
2 Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. *Interciência*,
3 v.28, p.699-704, 2003.
- 4 PAPA, F.O.; CRESPILO, A.M.; FREITAS DELLAQUA, C.P.; DELLAQUA JR, J.A.
5 Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de
6 avaliação. Biotecnologia da reprodução em bovinos, In: 3º SIMPÓSIO INTERNACIONAL
7 DE REPRODUÇÃO APLICADA. 2008. Botucatu. 2008.
- 8 PELLICER-RUBIO, M.T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat
9 sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with
10 triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1023–1031, 1997.
- 11 PELLICER-RUBIO, M. T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in
12 skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase
13 BUSgp60. *J. Reprod. Fert.*, v.112, p.95-105, 1998.
- 14 PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.*, v.63, p. 215-
15 225, 2006.
- 16 ROBERTSON, L.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. Temporal changes in motility parameters related
17 to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated
18 human sperm. *Biol. Reprod.*, v.39, p.797 – 805, 1988.
- 19 SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B. *et al.* Effect of different extenders and
20 centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing
21 ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*, v.73, p.316-323, 2010.
- 22 SUAREZ, S.S.; VAROSI, S.M., DAI, X. Intracellular calcium increase with hyperactivation
23 in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc. Nat. Acad.*
24 *Sci.*, v.90, p.4660 – 4664, 1993.
- 25 SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H. et al. Evidence for the function of hyperactivated
26 motility in sperm. *Biol. Reprod.*, v.44, p.375 – 381, 1991.
- 27 VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. et al. Isolation and characterization of
28 gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endoc.*, v.1, p.39, 2003.
- 29 VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, L. Computer assisted semen analyzers in
30 andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.

31

32

ANEXO A



ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvzscielo>>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo. Leia "PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE"

Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6). É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido. O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um

dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Committee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo". O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

O texto NÃO deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*. * na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).**

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação. **Nota:** Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e

teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, adaptadas para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.
- FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.
- HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

- DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.
- LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).
- MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.
- NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.
- SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

- QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.
- JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação

Taxa de submissão: A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada e m até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação:. A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo. OBS.: Quando os dados para a nota fi scal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

Submission and Publication fee. The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

Recursos e diligências

No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.