



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

Departamento de Ciências Agrárias

**Influência de diferentes curvas de congelação
sobre a integridade do acrossoma de células
espermáticas de sêmen caprino**

TESE DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA

Sofia Alexandra Fagundes Lopes

Angra do Heroísmo

2013



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

Departamento de Ciências Agrárias

**Influência de diferentes curvas de congelação sobre a
integridade do acrossoma de células espermáticas de
sêmen caprino**

Sofia Alexandra Fagundes Lopes

Orientadores:

Prof. Doutor Henrique José Duarte da Rosa

Prof. Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva

TESE DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA

Angra do Heroísmo

2013

Dedico esta tese à pessoa que mais me marcou durante o percurso acadêmico...ao meu bisavô pelos ensinamentos e sabedoria de viver

"Aprendi que não posso exigir o amor de ninguém...Posso apenas dar boas razões para que gostem de mim... E ter paciência para que a vida faça o resto..."

William Shakespeare

Agradecimentos

Não queria deixar de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que me acompanharam ao longo do percurso académico.

Ao meu orientador Doutor Henrique José Duarte da Rosa, pelo seu apoio, ensinamento, amizade e sobretudo paciência e disponibilidade prestada ao longo da realização deste trabalho.

Ao meu orientador Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva por todos os ensinamentos, amizade, conselhos e apoio durante todo o percurso académico.

Aos Serviços de Desenvolvimento Agrário da Ilha Terceira, em especial à Eng^a Marília Coelho, pelo empenho e dedicação na realização deste trabalho, bem como ao senhor Manuel Sampaio pelo auxílio prestado com o maneio dos animais.

Ao Doutor António Eduardo Nobre Chaveiro pelos ensinamentos e posterior auxílio nas avaliações de sémen.

Ao prof Doutor Eduardo Ferrandini Banchero, pelos seus ensinamentos quer a nível pessoal como profissional, amizade e carinho no final deste percurso académico.

Ao Eng.º. António Pedro Simões por me permitir realizar a parte experimental deste trabalho no horário laboral.

Ao meu colega e amigo Isac Rego pelo carinho, amizade e sobretudo paciência para aturar os meus picos de stress.

A todos os outros colegas que me acompanharam desde o início do percurso académico com a sua amizade e companheirismo nos bons e maus momentos. Porque amizade é isso mesmo vencer em conjunto os obstáculos!! Bem como na elaboração deste trabalho.

Aos pais pelos ensinamentos e valores transmitidos, bem como o apoio e incentivo ao longo de todo o percurso académico

À minha irmã por nunca duvidar das minhas capacidades e acreditar mais em mim do que eu própria, pela amizade e ajuda incondicional durante a realização deste trabalho. E ao meu cunhado por aturar as noitadas em sua casa

Um obrigado a todos porque este trabalho não foi meu.... foi nosso!!!!

Resumo

O presente trabalho teve como objectivo testar o efeito de 3 curvas de congelação diferentes sobre a integridade do acrossoma da célula espermática de caprinos. A colheita de sémen foi realizada nos Serviços de Desenvolvimento Agrário da Ilha Terceira (SDAT), tendo sido utilizados 3 bodes (2 de raça Saanen e 1 de raça Alpina) com mais de 2 anos de idade. As recolhas (3 por cada animal) foram efectuadas durante o mês de Fevereiro de 2012, em 3 sessões espaçadas de aproximadamente 5 dias, seguindo um desenho factorial de medições repetidas. As recolhas foram sempre efectuadas pela manhã, com inicio por volta das 08:00 horas e em cada período de colheita os bodes alternavam aleatoriamente. A colheita do sémen foi obtida com vagina artificial, após treino dos bodes, utilizando uma fêmea com cio induzido. A indução artificial do cio foi conseguida com uma injeção intramuscular de 250 µg de benzoato de estradiol diluído em 2 ml de óleo mineral, aplicada 24 a 48 horas antes do momento necessário, seguida de uma nova injeção passadas 24 horas na dose de 100 µg de modo a garantir o prolongamento do cio pelas próximas 24 horas. No laboratório procedeu-se à avaliação de características seminais como o volume, a concentração espermática e a mobilidade massal. De seguida efectuou-se a contagem dos espermatozóides vivos e mortos por citometria de fluxo e procedeu-se à congelação do sémen segundo as 3 curvas, que diferiam nas rampas de arrefecimento. As temperaturas das diferentes curvas foram iguais, variando apenas a temperatura de arrefecimento na segunda rampa (Curva A = 25 °C/min, Curva B = 35 °C/min e Curva C = 45 °C/min). Para testar a influência das referidas curvas sobre a integridade do acrossoma recorreu-se novamente ao citómetro e determinou-se a percentagem de espermatozóides vivos e mortos e com o acrossoma intacto ou danificado.

As diferentes curvas não influenciaram significativamente a taxa de mortalidade dos espermatozoides com acrossoma intacto ($11,6 \pm 0,63$ % spz Curva A, $11,36 \pm 0,63$ % spz Curva B e $10,37 \pm 0,63$ % spz Curva C) ou danificado ($68,78 \pm 1,39$ % spz Curva A, $70,54 \pm 1,39$ % spz Curva B e $70,96 \pm 1,39$ % spz Curva C). No entanto observou-se um efeito significativo dos bodes e dias de colheita nos quatro parâmetros estudados - percentagem de espermatozoides vivos com o acrossoma intacto (VAI) ou danificado (VAD) e percentagem de espermatozoides mortos com o acrossoma intacto (MAI) ou danificado (MAD). Relativamente à percentagem de espermatozoides VAI o bode 1 apresentou valores 50% inferiores aos bodes 2 e 3 ($P < 0,001$) e o dia de colheita afectou substancialmente este parâmetro ($25,33 \pm 0,66$ % spz dia colheita 1, $18,40 \pm 0,66$ % spz dia colheita 2 e $11,31 \pm 0,91$ % spz dia colheita 3; $P < 0,01$). A percentagem de espermatozoides VAD diferiu significativamente entre o animal 1 e 2 ($P = 0,016$) e entre os dias de colheita 1 e 3 ($P = 0,032$). No que se refere à percentagem de espermatozoides mortos, os factores animal e dia de colheita também afectaram significativamente os resultados. O bode 1 diferiu significativamente dos restantes na percentagem de espermatozoides MAI. Também para este parâmetro, os dias de colheita 2 e 3 revelaram-se significativamente diferentes ($P = 0,042$). Na percentagem de espermatozoides MAD o bode 1 diferiu dos bodes 2 e 3 ($P < 0,001$). Neste parâmetro verificaram-se diferenças significativas entre o dia 1 e os dias 2 ($P = 0,003$) e 3 ($P < 0,001$).

Os resultados deste ensaio permitiram concluir que as 3 curvas de congelação estudadas não influenciaram significativamente as taxas de mortalidade dos espermatozoides do sémen de caprino, sugerindo que qualquer delas se revelou eficaz na congelação de sémen desta espécie. Verificou-se no entanto uma variação significativa, quer entre animais quer entre dias de colheita, reafirmando estes factores

como bastante influenciadores da variabilidade frequentemente observada das capacidades fertilizantes do sémen congelado de caprino.

Abstract

This study was aimed to test the effect of 3 different freezing curves on the acrosome integrity of male goat sperm cell . The semen collection was performed at the Departments of Agrarian Development of Terceira Island (SDAT), using 3 bucks (2 Saanen and 1 Alpine breed) aged more than 2 years . Collections (3 per animal) were carried out during February 2012 in three sessions with 5 day-intervals, following a factorial experimental design with repeated measures. The collections were always made in the mornings, starting at around 08: 00 hours and during each collection period the bucks alternated randomly. The semen was collected with an artificial vagina after the bucks had been trained, with a female induced in heat. The artificial induction of heat was achieved with an intramuscular injection of 250 µg of oestradiol benzoate dissolved in 2 ml of mineral oil applied 24 to 48 hours prior to be necessary, followed by a further injection applied 24 hours after, at a dose of 100 µg in order to ensure the continuation of the heat for the next 24 hours. In the laboratory, took place the evaluation of seminal characteristics like volume, sperm concentration and massal mobility. After the counting of live and dead sperm by flow cytometry, the procedures followed with the freezing of semen according to the three curves, which differed in ramp cooling. The temperatures of the different curves were similar, varying only in the temperature of the second cooling ramp (Curve A = 25 ° C / min, Curve B = 35 ° C / min and Curve C = 45 ° C / min). To test the influence of the curves on the acrosome integrity the cytometer was used again to determine the percentage of live and dead spermatozoa and the acrosome integrity.

The different curves did not influence the mortality rate of sperm with intact acrosome ($11,6 \pm 0,63$ % spz Curve A, $11,36 \pm 0,63$ % spz Curve B e $10,37 \pm 0,63$ %

spz Curve C) or damagedo ($68,78 \pm 1,39$ % spz Curve A, $70,54 \pm 1,39$ % spz Curva B e $70,96 \pm 1,39$ % spz Curva C). However there was a significant effect of bucks and collection days in the four parameters studied - percentage of live sperm with intact (VAI) or damaged (VAD) acrosome and percentage of dead sperm with intact (MAI) or damaged (MAD) acrosome. Concerning the percentage of VAI sperm male goat 1 showed values 50% lower than goats 2 and 3 ($P < 0.001$) and collection day substantially affected this parameter (25.33 ± 0.66 % SPZ collection day 1, 18.40 ± 0.66 % SPZ collection day 2 and 11.31 ± 0.91 % SPZ collection day 3; $P < 0.01$). The percentage of sperm VAD differed significantly between animals 1 and 2 ($P = 0.016$) and between collection days 1 and 3 ($P = 0.032$). Regarding the percentage of dead spermatozoa, animal and collection day factors also significantly affected the results. Buck 1 significantly differed in the percentage of MAI spermatozoa. Also for this parameter, the collection days 2 and 3 were significantly different ($P = 0.042$). In percentage of the MAD spermatozoa buck 1 differed from bucks 2 and 3 ($P < 0.001$). In this parameter, there were significant differences between day 1 and day 2 ($P = 0.003$) and 3 ($P < 0.001$). The results of this experiment showed that the 3 freezing curves studied did not significantly influence the mortality rates of male goat spermatozoa, suggesting that any of them proved effective in freezing semen of this species. There was however a significant variation between animals and between collection days, confirming these as very influencing factors of the variability commonly observed in the fertilization ability of male goat semen.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	X
Índice	XII
Índice Quadros.....	XVI
Índice de Figuras	XVII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	XVIII
I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Anatomia e Fisiologia do Aparelho Reprodutor do Bode	3
2.1.1. Testículos	3
2.1.1.1. Epidídimo	6
2.1.2. Glândulas Anexas	8
2.1.3. Pénis.....	9
2.2. Sémen e Características Seminais	10
2.2.1. Plasma Seminal	10
2.2.2. Espermatozóides	11
2.3. Regulação Hormonal da Produção de Sémen.....	12
2.4. Espermatogénese	14
2.4.1. Espermatocitogénese.....	14
2.4.2. Espermiogénese	16
2.4.3. Ciclo Espermatogénico	17
2.5. Comportamento Sexual do Macho	19
2.5.1. Factores que afectam o Comportamento Sexual dos Machos	24
2.6. Sazonalidade.....	25
2.7. Recolha de Sémen em Caprinos	26

2.7.1. Recolha por Electroejaculação.....	27
2.7.2. Recolha por Vagina Artificial.....	28
2.7.2.1. Preparação da Vagina Artificial.....	29
2.7.2.2. Técnica de recolha com Vagina Artificial.....	31
2.7.3. Selecção dos Machos Dadores de Sémen.....	32
2.7.4. Preparação dos Machos Dadores de Sémen.....	33
2.7.5. Treino dos Machos Dadores de Sémen.....	34
2.8. Avaliação do Sémen.....	36
2.8.1. Avaliação Macroscópica.....	37
2.8.1.1. Cor, Cheiro e Aspecto do Sémen.....	37
2.8.1.2. Volume do Ejaculado.....	38
2.8.2. Avaliação Microscópica.....	40
2.8.2.1. Mobilidade.....	40
2.8.2.1.1. Características dos Movimentos das Ondas.....	40
2.8.2.1.2. Proporção Espermatozóides Móveis.....	42
2.8.2.2. Concentração.....	42
2.8.2.2.1. Visualização Directa da Consistência do Ejaculado.....	43
2.8.2.2.2. Contagem exacta com um Hemocitómetro.....	43
2.8.2.2.3. Densidade Óptima através de um Espectrofotómetro.....	45
2.8.2.3. Morfologia dos Espermatozóides.....	46
2.8.2.3.1. Percentagem de Espermatozóides Vivos e Anomalias Morfológicas.....	47
2.8.2.3.1.1. Preparação do Esfregaço.....	48
2.8.2.3.1.2. Anomalias Morfológicas.....	48
2.8.2.4. Técnicas de Avaliação de Sémen in Vitro.....	49
2.8.2.4.1. Citometria de Fluxo.....	51
2.8.2.4.1.1. Estrutura Básica e Funcionamento de um Citómetro de Fluxo.....	52
2.8.2.4.1.2. Processamento das amostras.....	54

2.8.2.4.1.3. Compostos Fluorescentes mais utilizados para a Citometria de Fluxo	54
2.8.2.4.1.4. Aplicações da Citometria de Fluxo	55
2.8.2.4.2. Análises Espermáticas Computadorizadas	56
2.9. Processamento e Conservação do Sêmen	58
2.9.1. Diluição do Sêmen	58
2.9.1.1. Diluidores	58
2.9.1.2. Método de Diluição	60
2.9.1.3. Volume de Sêmen e Número de Espermatozóides utilizados para Inseminação Artificial	60
2.9.1.4. Conservação do Sêmen	61
2.9.1.4.1. Sêmen Refrigerado	61
2.9.1.4.2. Sêmen Congelado	63
2.9.1.4.2.1. Congelação Convencional	64
2.9.1.4.2.2. Congelação Automatizada	65
2.9.1.5. Crioprotectores	66
2.9.1.5.1. Crioprotectores Intracelulares	66
2.9.1.5.2. Crioprotectores Extracelulares	67
III. Material e Métodos	69
3.1. Recolha de Sêmen	69
3.2. Avaliação do Sêmen	70
3.2.1. Cor e Consistência	70
3.2.2. Volume	70
3.2.3. Mobilidade Massal	70
3.2.4. Concentração Espermática	71
3.2.5. Percentagem de Espermatozóides Vivos no Sêmen Fresco	71
3.2.6. Percentagem de Espermatozóides Vivos e Integridade do Acrossoma no Sêmen após Descongelação	72
3.3. Diluição do Sêmen	72

3.4. Congelação do Sémen	73
3.5. Análise Estatística	74
IV. Resultados	75
4.1. Avaliação Macroscópica do Sémen.....	75
4.2 . Avaliação Microscópica do Sémen	76
4.2.1. Avaliação da Motilidade Massal.....	76
4.2.2. Concentração do Sémen.....	77
4.4. Avaliação por Citometria de Fluxo	78
4.4.1. Determinação da Relação entre Espermatozóides Vivos e Mortos	78
4.4.2. Determinação da Integridade do Acrossoma	78
4.5. Sémen Fresco vs Sémen Descongelado	81
V. Discussão	83
VI. Conclusões e Perspectivas Futuras.....	88
VII. Bibliografia	89
VIII. ANEXOS	100

Índice Quadros

Quadro 1 - Concentração Sêmen Avaliado pela Consistência	38
Quadro 2 - Determinação da Motilidade Massal	41
Quadro 3 - Curvas de Congelação com respectivas Rampas e Temperaturas de Arrefecimento	73
Quadro 4 – Médias e Erro Padrão dos parâmetros avaliados no sêmen fresco dos diferentes bodes. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas	77
Quadro 5 - Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma intacto (% spz VAI); vivos com acrossoma danificado (% spz VAD); mortos com acrossoma intacto(% spz MAI) e mortos com acrossoma danificado (% spz MAD)	80
Quadro 6 - Percentagem de espermatozóides vivos (% spz Vivos) vs mortos (% spz Mortos) no sêmen fresco e descongelado em função do bode e do dia de colheita	82

Índice de Figuras

Figura 1 - Partes Constituintes do Espermatozóide	11
Figura 2 - Esquema ilustrativo das etapas da Espermatogénese	15
Figura 3 - Ciclo Espermatogénico	18
Figura 4 - Esquema do Comportamento Sexual nas Fases de Côrte e Cópula	20
Figura 5 - Avaliação das Características Seminais por Observação Directa	39
Figura 6 - Grelha de Contagem do Hemocitómetro	44

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ARN - Ácido Ribonucleico

ALH - Amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide

BCF - Frequência de batimento flagelar cruzado

BSA - Albumina Sérica Bovina

CASA - Computer Assited Semen Analysis

cm - Centimetro

CP - Crioprotectores

DMSO - Dimetilssulfóxido

FITC - Isotiocionato de Fluoresceína

FITC - PSA - Isotiocionato de Fluoresceína associado à aglutinina de *Pisum sativum*

FSH - Hormona folículo estimulante

GH - Hormona de Crecimento

GnRH - Hormona libertadora de Gonodotrofinas

PI - Iodeto Propídico

LH - Hormona Luteinizante

LN - Linearidade

mg - Miligramas

ml - Mililitro

mM - Milimole

mm - Milímetro

mm² - Milímetro ao quadrado

mm³ - Milímetro ao cubo

MT - Motilidade total

MP - Motilidade progressiva

nm - Nanómetro

PBS - Solução tampão fosfato-salino

pH - Potencial hidrogeniónico

PRL - Prolactina

SDAT - Serviço de Desenvolvimento Agrário da Terceira

SNC - Sistema Nervoso Central

Spz - Espermatozóides

Spz/ml - Espermatozóides por mililitro

STR - Retilinearidade

SYBR-14 - Corante supravital

UHT - Ultrapasteurização

UI - Unidades Internacionais

VAP - Velocidade média do percurso

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade em linha recta

V/V - Volume por volume

WOB - Índice de oscilação

° C - Graus Celsius

° C/min - Graus Celsius por minuto

% spz MAD - Percentagem espermatozoides mortos com o acrossoma danificado

% spz MAI - Percentagem espermatozoides mortos com o acrossoma intacto

% spz VAD - Percentagem espermatozoides vivos com o acrossoma danificado

% spz VAI - Percentagem espermatozoides vivos com o acrossoma intacto

µg - Micrograma

µm - Micrómetro

µm/s - Micrómetro por segundo

I. Introdução

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento significativo do efectivo de caprinos a nível mundial devido ao seu acrescido valor económico e dos subprodutos que daí advêm. Contudo, apenas agora começa a ser notório o seu crescimento nos Açores, o qual tem interesse económico para a região. Neste contexto surge a necessidade de recorrer a técnicas de melhoramento genético, nomeadamente a inseminação artificial de acordo com os objectivos de cada produtor. A aplicação das biotecnologias reprodutivas repercute-se directamente no número de animais de elevada qualidade na exploração, principalmente pela utilização de inseminação artificial e de transferência de embriões. A aplicação destas técnicas associadas à indução e sincronização hormonal de estro e de ovulação permite a produção de crias e leite fora da época reprodutiva.

Apesar do recurso à inseminação artificial com sémen congelado não ser recente, ainda se verificam taxas de sucesso baixas. Isto deve-se ao facto do sémen caprino apresentar diferentes características em relação a outros ruminantes, como por exemplo os bovinos. Nos pequenos ruminantes, e em particular na cabra, a inseminação artificial desenvolveu-se sobretudo a partir dos anos 70 (Ponsart *et al.*, 2004). A criopreservação de sémen de mamífero é um complexo processo que envolve o equilíbrio entre vários factores, afim de se obter resultados satisfatórios. Apesar de todas as células suportarem stresses físicos semelhantes associados a estes processos, o sémen de diferentes espécies varia na composição, forma, tamanho e lípidos, os quais afectam a criopreservação. A diferença mais notória e que alguns autores afirmam diminuir a taxa de sobrevivência dos espermatozóides, aquando da congelação, é a presença de conteúdo enzimático proveniente das glândulas bulbo-uretrais, que se encontra no

plasma seminal. A enzima é a fosfolipase que hidrolisa a lecitina do diluidor à base de gema de ovo, em ácidos gordos e lisolecitinas que afectam a viabilidade espermática (Gibbons, 2002). Para além deste facto durante o processo de criopreservação o espermatozóide passa por mudanças estruturais nas membranas que resulta na diminuição da fertilidade.

Neste contexto, o principal objectivo do presente trabalho é a criopreservação de sémen de caprino sem a remoção do plasma seminal e congelá-lo segundo três curvas diferentes, de modo a testar a influência das mesmas sobre a integridade do acrossoma da célula espermática.

II. Revisão Bibliográfica

2.1. Anatomia e Fisiologia do Aparelho Reprodutor do Bode

O sistema reprodutor masculino é uma série de órgãos directamente associados ao processo reprodutivo. A sua principal função é proporcionar que o gâmeta ou espermatozóide masculino fecunde o óvulo, sendo os principais órgãos agrupados em três categorias.

A primeira categoria é a produção de espermatozóides e armazenamento. A produção ocorre nos testículos, que estão alojados no escroto, com temperatura regulada, de onde os espermatozóides imaturos se deslocam para o epidídimo, a fim de desenvolvimento e armazenagem.

A segunda categoria são as glândulas que produzem o líquido ejaculatório, que incluem as vesículas seminais, a próstata e a glândula bulbouretral.

A terceira categoria é aquela utilizada para a cópula e a deposição de espermatozóides (esperma) que estava no macho; nesta categoria estão o pénis, uretra e canal deferente.

2.1.1. Testículos

Os testículos são os principais órgãos do aparelho genital masculino, apresentam duas funções essenciais: a espermatogénese e a produção de hormonas. A espermatogénese é o processo no qual ocorre a produção de espermatozóides imaturos com uma duração aproximada de 61 dias nos ruminantes. A produção de hormonas ocorre no processo designado por esteroidogénese, originando-se essencialmente testosterona, progesterona e estrogénios. Os testículos durante o seu desenvolvimento

fetal descem o canal inguinal até ao exterior da cavidade abdominal, onde são revestidos pela bolsa escrotal. No escroto, os dois testículos, assumem uma posição vertical e uma forma ovóide, pesando cada um em média 50 a 300g, segundo a idade, a espécie, a raça, a época reprodutiva e o estado nutricional do animal (Baril *et al.*, 1993; Granados *et al.*, 2006). Os testículos devem apresentar-se simétricos em forma e tamanho, elásticos e com uma consistência firme e móvel a bolsa escrotal, a qual, nos adultos, atinge um perímetro de 25cm (Leite-Browning, 2009).

Cada testículo possui, o sistema sanguíneo e nervoso independente. A temperatura do testículo é sempre inferior às restantes células do corpo do bode, e para que o processo de espermatogénese ocorra em boas condições é necessário que a temperatura dos testículos se encontre ligeiramente abaixo da temperatura corporal, entre 4 a 7 graus centígrados a menos. Para este facto contribuem essencialmente os testículos e o escroto. Esta termorregulação é efectuada através da sudação testicular, bem como através do músculo cremaster. Estes músculos são uma espécie de bainhas musculares que permitem a aproximação dos testículos à entrada inguinal (Quittet, 1980; Sá, 1990). Do mesmo modo, quando a temperatura sobe quer por factores ambientais ou patológicos, o escroto distende-se ao máximo ficando os testículos com maior distanciamento da cavidade abdominal (Quittet, 1980; Sá, 1990). Este fenómeno permite a termorregulação, pois quando a temperatura exterior é elevada os testículos são colocados fora do corpo, aumentando a superfície de troca de calor e de irradiação, permitindo com que haja um abaixamento da temperatura corporal interna (Quittet, 1980; Sá, 1990). No entanto, se a temperatura testicular atingir a do restante corpo, por apenas algumas horas, o animal torna-se estéril cerca de 14 dias depois (Baril *et al.*, 1993).

Na pele escrotal existem ainda glândulas sudoríparas e receptores de temperatura que permitem o arrefecimento dos testículos por evaporação. A termorregulação também é efectuada em função da temperatura ambiente por aproximação ou afastamento dos testículos da cavidade abdominal, devido à contração ou relaxamento dos músculos dartos, respectivamente. A proximidade dos testículos é proporcionada em simultâneo pelo músculo cremáster externo.

A existência de um sistema de vasos ao longo dos testículos – plexo pampiniforme - permite também arrefecer o sangue arterial que chega a estes por um mecanismo de contracorrente. Para além, dos métodos de arrefecimento é importante o isolamento dos mesmos, que também, pode ser feito pelos pêlos que envolvem os testículos

Cada um dos testículos é revestido por tecido conjuntivo que forma uma espécie de cápsula, composta por fibras colagénicas e elásticas de cor esbranquiçada rodeada por artérias e veias testiculares – túnica albugínea. Depois, desta túnica, encontra-se o parênquima testicular que apresenta uma cor amarelada e está dividido em vários lóbulos (Sousa, 2000). A visualização destes lóbulos é possível através da secção de cada um dos testículos. Cada lóbulo é composto por vários túbulos seminíferos, onde ocorre a espermatogénese, e por tecido intersticial constituído por vasos sanguíneos, nervos e células de Leyding que segregam a testosterona sob o controlo da LH hipofisária (Baril *et al.*, 1993). Os túbulos seminíferos ocupam aproximadamente 80 a 90 % do parênquima testicular nos ruminantes, têm entre 1500 a 7000 m de comprimento total e cerca de 0,2 mm de diâmetro de lúmen que acumula e transporta o esperma até à rede testicular – *rete testis* (Baril *et al.*, 1993; Sousa, 2000).

Como foi referido anteriormente, os tubos seminíferos são compostos por células espermatogénicas, ou seja por células germinativas que originam o esperma, e por células de Sertoli, que garantem o suporte e a alimentação das primeiras, tal como a

libertação dos espermatozóides maduros no lúmen do tubo seminífero, desempenhado ainda função endócrina através da produção de FSH, Inibina e a proteína de ligação aos androgénios (Baril *et al.*, 1993; Sousa, 2000).

2.1.1.1. Epidídimo

O epidídimo é um órgão formado por um só tubo alongado e completamente ligado ao testículo. É no epidídimo que a *rete testis* desemboca e ocorre o transporte e armazenamento dos espermatozóides até à ejaculação, isto porque este órgão se subdivide em três zonas sucessivas e distintas: cabeça, corpo e cauda (Baril *et al.*, 1993). A cabeça do epidídimo encontra-se na zona proximal do testículo onde desembocam os ductos eferentes, o corpo do epidídimo compreende a zona entre a cabeça e a zona distal do testículo, onde se insere a cauda que liberta o seu fluido para ducto deferente. O contorno da cauda pode ser identificado através da palpação da pele do escroto (Evans e Maxwell, 1987; Meijer e Vlissingen, 1993).

Os canais anteriormente referidos são de extrema importância para desempenho reprodutivo do animal, pois é nestes que ocorre a maturação, transporte e armazenamento dos espermatozóides. O transporte é efectuado através dos canais eferentes à medida que os espermatozóides se vão produzindo nos testículos (Evans e Maxwell, 1987). O transporte ao longo do epidídimo pode demorar entre 10 a 14 dias, consoante a actividade do epitélio ciliado dos ductos eferentes, das contracções musculares e da frequência de ejaculação (Setchell, 1993; Garner e Hafez, 1993). É durante o transporte que os espermatozóides sofrem a maturação e ganham capacidade de mobilidade progressiva e de fertilização do oócito (Garner e Hafez, 1993). O armazenamento é efectuado na cauda do epidídimo, onde se encontra cerca de 75% dos espermatozóides epididimais (Evans e Maxwell, 1987; Ashdow e Hafez, 1993).

Segundo Amann (1987), os espermatozóides da cauda são mais férteis do que os do corpo do epidídimo, o que leva a pensar que na cauda adquirem uma maior capacidade fertilizante.

Os vasos deferentes são um par de canais desde a extremidade distal da cauda do epidídimo. Depois de sair da cauda do epidídimo segue até à zona proximal do testículo, onde se insere o cordão espermático. No início, o vaso deferente, é suportado por dobras do peritoneu, que passa ao longo do cordão espermático, através do canal inguinal para a região pélvica, onde se funde com a uretra (O'Donnell *et al.*, 2001). A extremidade do ducto deferente apresenta uma zona mais ampla que se designa por ampola, a qual no bode tem cerca de 6 a 7 cm de comprimento e 4 a 5 mm de diâmetro (O'Donnell *et al.*, 2001).

A ampola tem uma camada espessa de músculos nas suas paredes que segregam os constituintes do plasma seminal, servindo de depósito para armazenamento dos espermatozóides antes e nos intervalos das ejaculações (Sousa, 2000).

A uretra é um canal que se prolonga a partir da junção das ampolas até à extremidade do pénis, servindo de ducto excretor para a urina e sémen. Este canal possui duas porções: intra-abdominal e extra-abdominal. A porção intra-abdominal é caracterizada por uma acentuada curva sigmóide, designada por S peniano, uma vez que é accionada pelo músculo peniano. É a distensão desta curva que, no momento da cópula, permite o aumento de tamanho do pénis, pelo conseqüente aumento da zona extra-abdominal, e a respectiva introdução no aparelho genital feminino.

2.1.2. Glândulas Anexas

As glândulas anexas encontram-se ao longo da porção pélvica da uretra, com ductos que permitem expulsar as suas excreções para o exterior através da uretra. Elas compreendem as glândulas vesiculares, da próstata e bulbouretrais. Estas glândulas são responsáveis pela produção de fluido seminal, que alimenta, serve de tampão e fornece outras substâncias necessárias à motilidade e fertilidade dos espermatozóides (Leite-Browning, 2009).

As glândulas vesiculares, também designadas por vesículas seminais, são um par de glândulas lobulares que facilmente se identificam devido à sua aparência nodular (O'Donnell *et al.*, 2001). A aparência de “cacho de uva” destas glândulas permite acumular o esperma, sendo este o resultado da mistura dos espermatozóides com o líquido excretado pela próstata (Sá, 1990). As glândulas vesiculares do bode apresentam entre 2,5 a 4 cm de comprimento, 2 a 2,5 cm de largura e 1 a 1,5 cm de espessura (Leite-Browning, 2009).

A próstata é uma glândula única localizada em torno e ao longo da uretra e que elimina as suas secreções através de vários ductos existentes na uretra, contribuindo para o volume de sémen em todas as espécies (Sousa, 2000; Leite-Browning, 2009). Apesar de pouco abundante a secreção da próstata é rica em aminoácidos e enzimas que contribuem para aumentar a mobilidade dos espermatozóides (Sousa, 2000). As secreções da próstata, também, são ricas em iões inorgânicos com sódio, cloro, cálcio e magnésio (Leite-Browning, 2009). Esta glândula é composta por duas partes, a *pars disseminata*, composta por elementos glandulares ao longo da uretra, e o corpo situado atrás da entrada do ducto deferente. Os pequenos ruminantes apenas apresentam a *pars disseminata*, sendo a glândula bilobulada e situada na zona dorsal da uretra. Nestes animais, a próstata mede entre 3,5 a 4 cm de comprimento e 1 a 1,5 cm de largura.

As glândulas bulbouretrais ou de Cowper são em número de duas e encontram-se na uretra junto à saída da pélvis (Leite-Browning, 2009). Estas glândulas são pequenas, esféricas, compactas e envolvidas pelo músculo uretral (Sousa, 2000). Na zona proximal o músculo é esponjoso, pelo que não pode ser visualizado por via rectal. Cada glândula tem um ducto que desemboca na parede dorsal da uretra. Nos pequenos ruminantes as glândulas de Cowper medem 1cm de diâmetro, sendo no bode apenas tubular.

2.1.3. Pénis

O pénis é o órgão copulador do macho, ou seja, permite com que os espermatozóides sejam depositados no interior do aparelho genital feminino. É constituído pela uretra, pelo corpo esponjiforme que envolve a uretra e pelo corpo cavernoso (Ashdow e Hafez, 1993). Nos caprinos, como nos bovinos o tecido cavernoso apesar de existente é muito pouco desenvolvido, sendo o aumento de volume do pénis proporcionado pela distensão do “S” peniano.

O pénis do bode é revestido por tecido fibroso com veias pouco desenvolvidas que lhe conferem rigidez, inclusive na fase quiescente (Sousa, 2000). Apresenta um prolongamento vermiforme que lhe permite distribuir de forma mais homogénea e eficaz o sémen no tracto genital feminino. Também é enervado por fibras sensoriais, particularmente na glande onde se encontra o apêndice vermiforme com 3 a 4 cm de comprimento (Ribeiro, 1997). Este apêndice, também designado por filiforme e é a continuação da uretra

A extremidade do pénis encontra-se alojada numa invaginação de pele designada por prepúcio. O prepúcio tem como função recobrir e proteger a glande do pénis. Também tem glândulas tubulares que segregam uma substância gorda, que facilita a penetração do pénis no tracto reprodutor feminino aquando da cópula (Sousa, 2000).

2.2. Sémen e Características Seminais

O sémen é constituído pelo plasma seminal e pelos espermatozóides, variando a sua composição consoante as espécies.

2.2.1. Plasma Seminal

O plasma seminal constitui a parte líquida do sémen produzido nos testículos, o qual é segregado pelas glândulas vesiculares, epidídimo, ductos deferentes, próstata e glândulas bulbo-uretrais. Este fluido é isotónico e neutro, rico em numerosas substâncias orgânicas e inorgânicas, como a fructose, ácido ascórbico, inositol, sódio, potássio, cálcio, fosfolípidos, prostaglandinas e proteínas que servem para proteger e nutrir os espermatozóides (Maia, 2010). Para além destes compostos o plasma seminal é constituído por 75% de água. A fructose é o açúcar mais facilmente metabolizável e proporciona a maior fonte de energia que os espermatozóides recebem. Outros compostos facilitam a penetração dos espermatozóides nas vias genitais, tais como sorbitol, inositol, ácido cítrico, gliceril-fosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas em elevada concentração ($>40\mu\text{/ml}$) (Guerreiro, 2002).

O plasma seminal tem essencialmente três funções, tais como transportar os espermatozóides através do aparelho reprodutor, durante a ejaculação. Também funciona como activador dos espermatozóides, previamente imóveis e proporciona um meio tamponizado e rico em nutrientes, garantido a sobrevivência dos mesmos depois de depositados no aparelho reprodutor da fêmea.

2.2.2. Espermatozóides

Designam-se por espermatozóides os gâmetas masculinos produzidos nos tubos seminíferos dos testículos. São células complexas e altamente especializadas que devem manter a integridade de todas ou parte das suas funções para serem fecundantes. No bode, o espermatozóide tem aproximadamente 60 μm de comprimento, sendo formado por três zonas distintas: cabeça, peça intermediária e cauda (Fig. 1).

É na cabeça que se encontra a informação genética transmitida à descendência, uma vez que é nesta zona do espermatozóide que está contido o ADN, uma pequena quantidade de citoplasma e o acrossoma. Este último forma uma espécie de vesícula, que contém enzimas hidrolíticas fundamentais para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida (Vidigal, 2008). O tamanho da cabeça do espermatozóide pode variar entre 8 a 10 μm de comprimento, 4 μm de largura e 1 μm de espessura (Guerreiro, 2002).

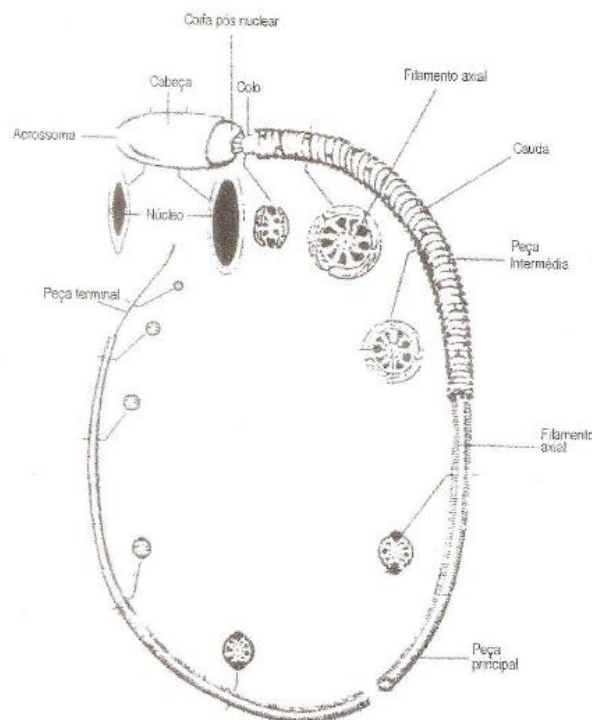


Figura 1 - Partes Constituintes do Espermatozóide

Adaptado: Baril *et al.*, 1993

A peça intermediária ou colo é a zona intermédia do espermatozóide que estabelece a ligação entre a cabeça e a cauda.

A cauda ou, também designado por, flagelo é a peça do espermatozóide que lhe confere a locomoção. É este factor que nos permitir visualizar a motilidade espermática na presença de fluidos (Vidigal, 2008). A cauda pode ser subdividida em três zonas, as quais são designadas por peça proximal, principal e terminal. A peça proximal é a parte mais grossa do flagelo que se encontra junto ao colo. Esta peça encontra-se rodeada por mitocôndrias, que conferem energia necessária à locomoção do espermatozóide. A peça principal é a estrutura mais comprida e que contém a maior parte dos elementos propulsores da cauda, sendo revestida por uma bainha fibrosa. Por último, a peça terminal que é mais curta do que as restantes, mas não menos importante uma vez que tem a função locomotora (Guerreiro, 2002; Maia, 2010).

Todas as características estruturais do espermatozóide estão focalizadas numa única actividade funcional, ou seja, em assegurar a libertação do material genético contido no núcleo para o ovócito, onde ocorre a fertilização produzindo-se o zigoto.

2.3. Regulação Hormonal da Produção de Sêmen

A puberdade nos bodes é atingida aos 6-7 meses de idade, contudo pode variar em função de diversos factores, tais como os níveis hormonais de testosterona e de gonodotrofinas segregadas durante o período pré-puberdade; raça; nível nutricional e sobretudo pelas condições do meio ambiente. No entanto, alguns estudos demonstram que o processo endócrino se inicia enquanto feto. Contudo, os níveis de testosterona diminuem após o nascimento, o que leva a crer que a testosterona fetal tem a ver com a diferenciação sexual e com o crescimento dos órgãos sexuais no feto.

A produção de testosterona é controlada pelo cérebro, através do Complexo Hipotálamo-Hipófise. Desta forma, o Hipotálamo liberta GnRH a qual actua sobre o lóbulo anterior da hipófise que por sua vez liberta duas hormonas para o sangue, que levam a informação aos testículos. São essas hormonas a Folículo-Estimulina (FSH) e a Luteinizante (LH). Com o início da puberdade ocorre um pronunciado aumento dos níveis de testosterona, que está relacionado com o padrão de segregação da LH, que estimula a segregação directa de testosterona nas células de Leyding.

O início da puberdade é estabelecido por eventos que ocorrem ao nível do sistema nervoso central (SNC) e que contribuem para alterar o padrão de segregação hipotalâmica de GnRH. Assim, o crescimento e a maturação testicular são influenciados por factores hormonais e possivelmente pelo sistema nervoso (González, 2002).

A FSH estimula a produção de receptores para gonodotrofinas no testículo, e a sua segregação é aumentada pelo crescimento testicular. Hormonas como a FSH, a hormona de crescimento (GH) e prolactina (PRL) contribuem para induzir a resposta testicular à acção da LH. Estas hormonas aumentam no sangue durante o desenvolvimento sexual. À medida que a puberdade vai sendo atingida os níveis de testosterona aumentam de forma progressiva até à idade adulta.

De um modo geral, a puberdade é atingida por acção de um mecanismo central que activa a libertação de GnRH. Os centros hipotalâmicos produtores de GnRH proporcionam um estímulo primário para o início da maturação sexual.

2.4. Espermatogénese

O início da produção de espermatozóides representa apenas o final de um processo complexo e com várias alterações. Estas têm início no período pré-natal, quando as células germinativas primordiais migram da crista germinal e permanecem nas gonadas algum tempo antes da diferenciação sexual. Os machos enquanto feto e animais jovens têm os gonócitos contidos dentro de túbulos seminíferos. Estes multiplicam-se depois do nascimento do animal e originam as espermatogónias. A eficácia quantitativa da espermatogénese (Fig. 2) depende sobretudo da forma como as divisões ocorrem. As células originárias da última divisão das espermatogónias são os espermatócitos primários os quais por divisão meiótica originam células filhas - os espermatócitos secundários.

2.4.1. Espermatocitogénese

Como referido anteriormente, é a partir das espermatogónias (Fig. 2) que se formam os espermatozóides. Estas são células diploides com 60 cromossomas no bode. As espermatogónias consoante a sua morfologia e o seu estado de diferenciação podem dividir-se em três tipos: A, intermédio (In) e B (Sousa, 2000).

As espermatogónias do tipo A por multiplicação mitótica originam duas células filhas, sendo uma activa (A1) e outra de reserva (A0). As espermatogónias de reserva permanecem latentes e servem para substituir outras, ou seja, em situações em que ocorra danificação testicular por irradiação, tóxicos, inflamações ou infeções. Contrariamente, as espermatogónias A1 multiplicam-se por mitoses originando espermatogónias do tipo A2, A3, A4, In e B. As diferentes populações de espermatogónias permanecem ligadas por pontes intracelulares de 2 a 3 μm de largura,

separadas das células de Sertoli por espaços intracelulares de 0,2 μm (González, 2002; Filho, 2006).

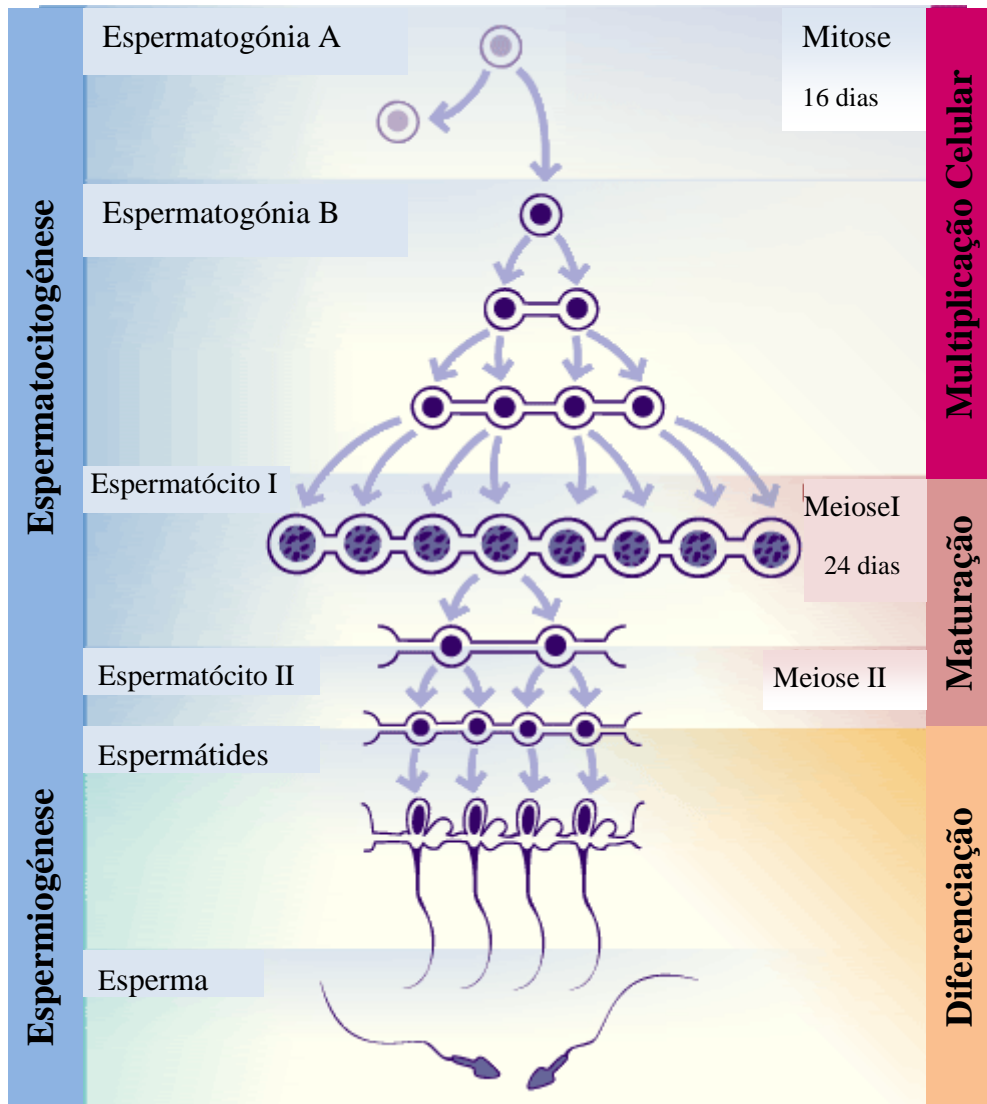


Figura 2 - Esquema ilustrativo das etapas da Espermatogênese

Adaptado: <http://embriologiaufpe.blogspot.pt/2010/09/espermatogênese-testiculo.html>

As células do tipo B ($2n$) sofrem seis divisões mitóticas sucessivas, originando os espermatócitos primários. Os espermatócitos primários, também designados por auxócitos, são caracterizados por grandes células ovais, de núcleo visível (González, 2002). Os espermatócitos primários originam células tetraploides. Durante a profase, da primeira meiose da espermatogênese, as células sofrem alterações nucleares, tais como,

a troca de material genético entre cromátídeos (crossing-over) e a disjunção dos heterocromossomas X e Y (Sousa, 2000). Os espermatócitos primários após a meiose dividem-se e originam os espermatócitos secundários. Estes são caracterizados por células diploides aos pares, as quais sofrem uma segunda meiose, ficando os cromossomas em número haploide. Na anafase os centrómeros dividem-se e os cromátídeos de cada par, depois de serem convertidos em cromossomas, separam-se, passando para as diversas células filhas, designadas por espermátides (Baril *et al.*, 1993).

2.4.2. Espermiogénese

Define-se por espermiogénese o conjunto de alterações nucleares e citoplasmáticas que ocorrem nas células espermátides e que, por sua vez, levam à formação dos espermatozóides. Esta etapa é fundamental, uma vez que é desta que depende a qualidade dos espermatozóides.

O processo de espermiogénese é caracterizado por três etapas principais. Na primeira fase, inicia-se a formação da cabeça do espermatozóide, a qual tem origem a partir do núcleo da espermátide. O acrossoma, existente na cabeça, contém grande variedade de enzimas lisossomais, as quais são importantes na penetração da zona pelúcida do óvulo, uma vez que este se forma a partir do aparelho de Golgi. De seguida ocorrem alterações no núcleo do acrossoma, tais como o deslocamento do centro para a periferia, condensação da cromatina e redução do volume nuclear. Estas alterações coincidem com mudanças na cabeça do espermatozóide. (González, 2002). Por fim, um dos centríolos migra da periferia para o centro do espermatozóide e o outro origina a cauda. A cauda tem origem a partir de um vasto conjunto de alterações, que compreendem, a formação do filamento axial, da peça intermédia, da peça principal e da

bainha mitocondrial (Sousa, 2000; González, 2002). O filamento axial é uma estrutura similar aos cílios e flagelos, com um axonema de 9 túbulos pares periféricos e um par de túbulos centrais, todos formados por proteínas contrateis chamadas tubulina e dineína, que são similares a actina e miosina, unidas por pontes de nexina (González, 2002).

A espermiogénese é finalizada com a libertação dos espermatozóides imaturos (espermátides) nos túbulos, como resultado da contração das células mioepiteliais dos túbulos seminíferos. Esta etapa é designada por espermição. Durante este processo formam-se "corpos residuais" no citoplasma das células de Sertoli, como resultado da actividade do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático, sendo depois fagocitados pelas próprias células de Sertoli (González, 2002).

2.4.3. Ciclo Espermatogénico

O ciclo espermatogénico (Fig. 3), também designado por ciclo do epitélio seminífero é o resultado de associações celulares da espermatogénese que aparecem ao longo dos tubos seminíferos. Quando as associações celulares se repetem é estabelecido um ciclo seminífero. Podem existir várias associações celulares distintas dependendo da espécie. Cada associação tem tipos distintos de células germinativas em vários estados, determinados basicamente por diferenças morfológicas.

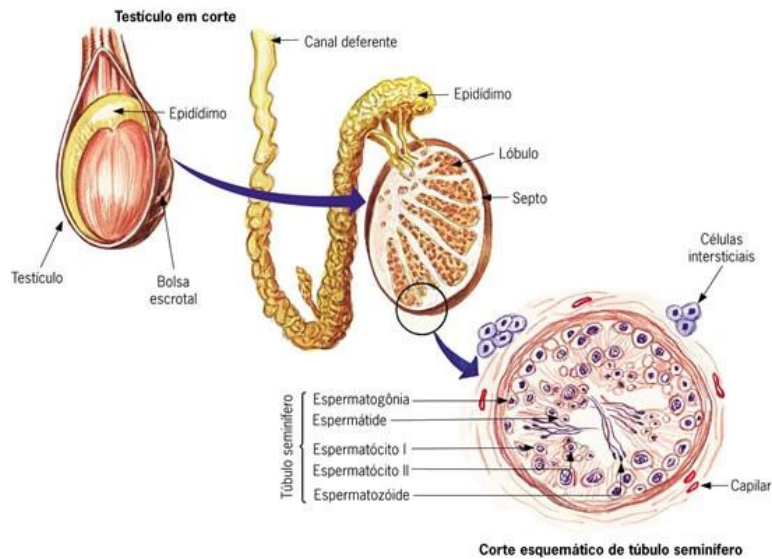


Figura 3 - Ciclo Espermatogénico.

Adaptado: <http://embriologiaufpe.blogspot.pt/2010/09/espermatogenese-testiculo.html>

A duração de um ciclo seminífero é o tempo que decorre entre o aparecimento, sucessivo, da mesma associação celular. Há uma relação entre a duração do ciclo espermatogénico e a espermatogénese, isto é, a espermatogénese tem aproximadamente quatro vezes a duração do ciclo espermatogénico, o que provoca associações características de células dentro de uma área de clonagem dos tubos seminíferos. Cada espermatogónia substitui a célula mãe e divide-se em intervalos de tempo característicos de cada espécie. Pressupõe-se que esse intervalo no bode seja de 10 dias (González, 2002).

O ciclo completo da espermatogénese, começando na primeira divisão espermatogonial e terminando na libertação dos espermatozóides no lúmen do tubo seminífero, tem a duração de 49 dias (Baril *et al.*, 1993).

2.5. Comportamento Sexual do Macho

O comportamento sexual é o conjunto de atitudes e iniciativas específicas que desenvolvidas por dois elementos do sexo oposto induzem naturalmente à cópula. Cada uma das etapas que origina este, comportamento sexual, implica um estado motivacional, comunicação entre parceiros e reações fisiológicas coordenadas estando sujeito a factores genéticos, ambientais, nutricionais e hormonais (Vitaliano, 2011). No comportamento sexual podem distinguir-se dois aspectos essenciais: o interesse na aproximação a indivíduos do sexo oposto (libido) e a realização do acto sexual.

O comportamento sexual no macho compreende um conjunto complexo de actividades que podem envolver uma reacção individual ou mudanças fisiológicas, tais como, a interacção entre dois ou mais indivíduos, cada um respondendo à actividade do outro. De um modo generalizado e simplificado para que ocorra o comportamento é necessário a existência de um estímulo (interno ou externo) que interaja com o sistema nervoso (Vitaliano, 2011).

Nos caprinos, tal como nas outras espécies, o comportamento sexual é proporcionado por factores intrínsecos e extrínsecos aos animais. Os factores intrínsecos de maior ênfase são os níveis de hormonas esteroides. Também é de salientar os factores genéticos, uma vez que existem diferenças de libido entre raças e linhagens.

A primeira etapa característica do comportamento reprodutivo é a procura e identificação do parceiro, seguidas da cõrte, monta e por fim cópula (Fig. 4). Para que estas características sejam concretizadas é indispensável a capacidade sensorial, nomeadamente do macho, permitindo-lhe assim uma avaliação do estado fisiológico da fêmea. Para que haja interacção com o ambiente e entre os animais, estes socorrem-se dos seus cinco sentidos (Sousa, 2000; Vitaliano, 2011)

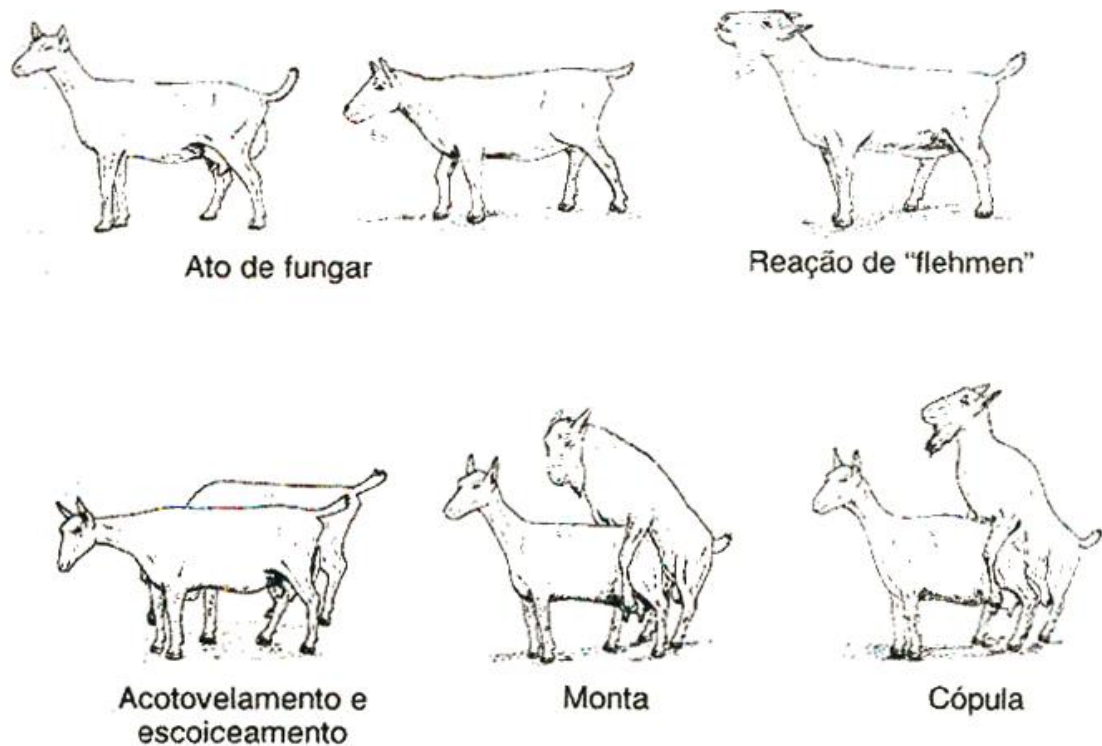


Figura 4 - Esquema do Comportamento Sexual nas Fases de Côrte e Cópula

Adaptado: Oliveira, 2009

Na procur e identificação da parceira por parte do macho é fundamental o olfacto, sendo este o responsável pelo desencadear do comportamento reprodutivo. Após a identificação da fêmea em cio, que se caracteriza pelo início do cortejo, o macho continua a testar a receptividade da fêmea através de várias tentativas de monta (Vitaliano, 2011). As atitudes e actividades desenvolvidas pelo casal aquando do comportamento reprodutivo resultam da resposta de certas substâncias químicas. Entre estas substâncias encontram-se as feromonas, fundamentais na comunicação entre organismos da mesma espécie. A comunicação química estabelecida entre animais da mesma espécie é semelhante ao sistema endócrino de um indivíduo. Os mensageiros químicos libertados pelos indivíduos actuam ao nível de receptores específicos desencadeando respostas comportamentais e/ou fisiológicas. A diferença existente entre

feromonas e hormonas deve-se ao facto de estas últimas serem libertadas no interior do indivíduo influenciando deste modo o metabolismo do mesmo, enquanto que as feromonas são libertadas para o exterior influenciando outros indivíduos da mesma espécie (Vitaliano, 2011). Desta forma, as feromonas permitem a comunicação pela ausência de sons e sinais visuais, mas sim pela existência de odores químicos que são libertos no meio exterior, pela urina, fezes ou por via cutânea. As reacções que derivam das feromonas são divididas em 30 grupos diferentes. As mais conhecidas são o reconhecimento do parceiro sexual e parental, tal como, a marcação territorial e de caminhos, existindo também reacções de agregação, dispersão e organização hierárquica dentro da comunidade e de alarme, que são libertas em situação de perigo (Vitaliano, 2011).

Segundo Kelliher (2007) nos mamíferos, os químicos odoríferos que chegam à cavidade nasal são detectados por receptores sensoriais localizados no epitélio olfactivo, no sistema vomeronasal ou em ambos. Este órgão encontra-se no interior da cavidade nasal numa cápsula cartilaginosa, ligada por terminações nervosas ao hipotálamo (Vitaliano, 2011). Depois de recebido o estímulo pelo órgão, o impulso é conduzido aos nervos vomeronasais seguindo para o cérebro, onde é activado o centro neuronal. É a partir deste sinal que se desencadeiam sentimentos de prazer como o relacionamento sexual, sendo a hipófise estimulada e conseqüentemente as gonadas através de sinais endócrinos (Vitaliano, 2011).

O órgão vomeronasal apenas tem como função receber as feromonas e converter nas respectivas emoções e comportamentos, provocando respostas específicas de conduta e desenvolvimento ou reprodução no receptor (Vitaliano, 2011).

Nos caprinos, tal como na maioria das espécies, o comportamento sexual depende essencialmente de dois factores; de factores internos, referidos anteriormente, como é o

caso da taxa de hormonas esteroides e factores externos como a sazonalidade (Vitaliano, 2011).

O comportamento sexual do macho baseia-se essencialmente em dois factores: a libido e a capacidade de serviço. A libido é definida como o desejo que o macho tem de montar e realizar a cópula. Designa-se por capacidade de serviço, a capacidade que o macho apresenta ao montar e realizar a cópula na fêmea. Em primeiro lugar o comportamento sexual de um macho adulto depende de secreções hormonais, e seguidamente de eventos sociais. O desencadear do acto sexual resulta da interacção destes dois factores, sendo o segundo factor o responsável pelo desencadear do primeiro. Factores externos como nutrição ou clima, podem ainda interagir com os factores endócrinos e sociais (Vitaliano, 2011).

Na época reprodutiva, a procura de parceira por parte do macho deve-se, essencialmente, à existência de feromonas libertadas pelas fêmeas, na altura de cio, e pela motivação sexual e transmissão de sinais acústicos e visuais.

Os comportamentos padrão que induzem à cópula são a incitação sexual, fase de cortejo, erecção, monta, introdução do pénis, ejaculação, desmonta e fase refractária. Segundo Patiño (2002), o comportamento sexual do macho distingue-se em duas fases principais: fase apetitiva (côrte) e fase de consumação (cópula).

Na côrte, o macho aproxima-se da fêmea lateralmente, adoptando uma postura com a cabeça baixa e prolongada em continuidade com as costas e mantendo as orelhas deitadas. De seguida, procede-se à identificação olfativa, onde o macho cheira e lambe a região anogenital da fêmea. Na maioria dos casos o primeiro contacto directo entre os indivíduos é o farejo ano-genital. Estes farejos são de curta duração e por vezes repetidos entre comportamentos (Sousa, 2000).

O acto de fungar permite ao macho inalar as feromonas libertadas pela fêmea através da urina, manifestando um reflexo olfactivo denominado por “Reflexo de Flehmen”. Durante este reflexo (Fig. 4) o macho faz fortes inalações no ar com o pescoço estendido, retrai o lábio inferior e levanta o superior (Sousa, 2000; Vitaliano, 2011). Segundo O'Brien (1982), refere que este reflexo também pode ser desencadeado quando o macho cheira a própria urina ou a urina de outros machos. Segundo Sousa (2000), funcionalmente, o Flehmen parece estar relacionado com o transporte de substâncias voláteis quimio-sensoriais da cavidade oral para o órgão vomeronasal.

As aproximações ritualizadas do macho são caracterizadas por vários movimentos à volta da fêmea acompanhados de pequenos toques com as patas dianteiras e com a cabeça, principalmente nos quartos traseiros das fêmeas, e pela vocalização exteriorizando e retraindo a língua várias vezes seguidas (Sousa, 2000; Vitaliano, 2011). Se o macho reconhece a falta de indícios de feromonas troca de fêmea. O bode também bate e raspa os cascos no chão evidenciando a sua masculinidade. Todo este conjunto de movimentos permite ao macho identificar se a fêmea está em cio, desencadeando a reacção de encabritamento. Após o cortejamento o macho alinha-se com a fêmea, seguindo-se o salto. O tempo de reacção, desde o primeiro contacto com a fêmea até à cópula, é muito curto (menos do que cinco minutos), podendo ocorrer durante esse tempo falsos saltos por parte dos machos.

Caso o macho detecte que uma fêmea se encontra na fase de proestro, faz várias tentativas de monta, ficando o pénis parcialmente erecto. No entanto, estas montas geralmente não se realizam. Mas se a fêmea se encontrar em cio a cópula ocorre em segundos, dependendo da receptividade da fêmea e da eficácia e motivação do macho. Alguns machos conseguem introduzir o pénis no primeiro salto, enquanto outros necessitam de encontrar a posição ideal, sendo para isso necessário efectuarem vários

saltos. A ejaculação, é caracterizada por uma contracção muscular intensa e pelo levantar da cabeça, tendo uma duração de um segundo (Sousa, 2000). Após a ejaculação o macho desmonta de imediato, seguindo-se um período refractário ou de recuperação pós-cópula no qual não manifesta motivação sexual (Sousa, 2000). A duração do período refractário aumenta gradativamente após sucessivas coberturas com a mesma fêmea (Vitaliano, 2011).

2.5.1. Factores que afectam o Comportamento Sexual dos Machos

O comportamento sexual do macho é influenciado pela experiência que cada indivíduo possui, variando na mesma proporção a frequência e duração dos comportamentos e a ejaculação. Estes critérios são utilizados para classificação e seleção de reprodutores. O comportamento sexual também é influenciado por factores genéticos, fisiológicos e hormonais. Existem diferenças de libido entre raças, linhagens e idades dos indivíduos. Os bodes das raças utilizadas para produção de leite são mais activos sexualmente do que os machos das raças de carne. No entanto, existe outro factor que determina a libido do animal, sendo este o nível de nutrição a que é submetido e as suas características qualitativas.

O contacto prévio dos machos com as fêmeas fornece-lhes prática na execução da cópula e ajuda na desinibição de machos inexperientes. Segundo Stellflug e Lewis (2007), a frequência e duração de cada comportamento depende de cada reprodutor e da sua experiência sexual prévia, servindo como critério de avaliação, classificação e seleção de reprodutores. A expressão sexual do macho pode ainda ser influenciada por factores fisiológicos como a existência de problemas físicos ou psíquicos, tais como peeira, eczemas, problemas nas articulações e medo (Sousa, 2000). Os factores sociais que mais desencadeiam apetite sexual no macho são a incorporação de novas fêmeas no

efectivo e a presença de outros machos na altura da cópula. A utilização de estímulos não específicos como choques eléctricos, alteração do local de recolha e troca de fêmea aumentam a frequência de ejaculação e diminuem o período refratário. A hierarquia estabelecida no grupo pode influenciar a actividade sexual do macho quando vários competem pela mesma fêmea. Deste modo, o macho dominante efectua a maior parte das cópulas influenciando negativamente a actividade sexual dos restantes machos do grupo: a obtenção de um território, posição social dominante, formação de um parceiro, por exemplo.

2.6. Sazonalidade

A maioria dos caprinos tem origem em países temperados, o que se traduz numa acentuada variação na sazonalidade reprodutiva. Segundo Delgadillo e Chemineau, (1992), o decréscimo de horas de luz estimula a secreção de LH pela hipófise, via GnRH do hipotálamo, o que leva ao crescimento testicular e libertação de testosterona. Deste modo, os caprinos são animais de dias curtos, ou seja, o seu período de actividade sexual ocorre durante os dias de menor intensidade luminosa (8 horas de luz). Contrariamente, os dias mais longos têm efeito inibitório sobre a actividade reprodutiva dos caprinos (16 horas luz) (Dantas, 2009). Nas regiões temperadas o fotoperíodo é um factor decisivo, tendo grande influencia sobre as concentrações hormonais de LH, FSH, testosterona e prolactina. A diminuição do fotoperíodo estimula a secreção de LH e FSH pela hipófise, verificando-se consequentemente um aumento da actividade testicular e da produção de testosterona. Quando os dias são longos ocorre uma diminuição da secreção de gonadotrofinas e testosterona (Vitaliano, 2011).

A percepção da luz pela retina do olho desencadeia uma série de estímulos que activam a adeno-hipofise e, conseqüentemente, a produção e libertação de gonodotrofinas. A luz é recebida por fotoreceptores que enviam uma série de mensagens em cadeia a nível neural até activar a glândula pineal, que converte o estímulo neural em sinal hormonal. É este sinal hormonal que permite activar ou não a secreção de melatonina (Dantas, 2009). A glândula pineal na ausência de luz no meio ambiente, produz a melatonina que, por sua vez, estimula o hipotálamo, a hipófise e os testículos (ou os ovários) ao retorno da actividade reprodutiva (Muniz, 2003). Existe uma relação directamente proporcional entre a secreção de melatonina e a duração do período nocturno, que podem ser indutivos ou supressivos. Sinais indutivos de melatonina estimulam o ciclo hormonal reprodutivo, enquanto sinais supressivos inibem (Karsch, 1984, Dantas, 2009).

A melatonina é uma hormona presente no organismo de todos os mamíferos, sendo produzida e secretada durante a noite pela glândula pineal (Muniz, 2003; Dantas, 2009). A síntese da melatonina inicia-se a partir do triptofano, com a serotonina acetilada a Nacetilserotonina, a qual é metilada, resultando na melatonina.

2.7. Recolha de Sémen em Caprinos

A qualidade com que é efectuada uma recolha de sémen é de extrema importância para o sucesso de um programa de inseminação artificial. Uma boa recolha de sémen engloba o processo de escolha e preparação dos animais com intervalos adequados e domínio da técnica por parte do técnico.

Em caprinos, os métodos de recolha de sémen podem ser variados, tais como excitação mecânica do pénis, colector vaginal, sendo contudo o método da electroejaculação e da vagina artificial o mais utilizado.

2.7.1. Recolha por Electroejaculação

Existem diferentes tipos de estimuladores eléctricos. O de uso mais comum é de uso rectal com um electrodo bipolar. Os estimuladores eléctricos apresentam uma bateria com 10 a 15 volts. Segundo Evans e Maxwell (1987), quando o animal apresenta o recto seco é recomendado utilizar uma descarga de 15 volts. Recomenda-se que os estímulos sejam aplicados a cada sete segundos com um aumento de 1 volt. A ejaculação ocorre após 4 a 7 estímulos (Muniz, 2003).

Este método apenas deve ser utilizado em machos reprodutores que não possam ser treinados ou que se recusem saltar perante vagina artificial. No entanto, a aplicação deste método faz com que aumente a quantidade de plasma seminal na recolha do sémen. Durante a recolha, o bode pode estar de pé ou deitado de lado sobre uma mesa. Antes da recolha deve-se proceder à limpeza da glândula do pénis, e segurar na mesma com uma gaze estéril para que o apêndice filiforme e a uretra fiquem dirigidos para o interior do tubo de recolha e assim diminuir as perdas de sémen. O volume do ejaculado, pelo método de electroejaculação, é ligeiramente superior ao recolhido pelo método de vagina artificial e com uma concentração espermática mais baixa. (Muniz, 2003). A sonda rectal deve ser humedecida ou lubrificada com vaselina ou gel de palpação rectal e introduzida no recto a uma profundidade de 15 a 20 cm, com cuidado de modo a evitar lesões, nomeadamente na mucosa intestinal (Guerreiro, 2002). O pénis deve ser distendido de modo a endireitar a curva sigmoide e assim facilitar a sua remoção do prepúcio. A glândula do pénis deve ser, levemente, segurada para trás com uma gaze estéril, de modo a que o apêndice filiforme e a uretra sejam dirigidos para dentro do tubo de colheita antes da ejaculação, para diminuir a perda do sémen (Evans e Maxwell, 1987; Muniz, 2003). A forma mais adequada é segurar no tubo com uma mão e no pénis com a outra, para que seja possível massajar o pénis para a frente entre os

estímulos eléctricos (Evans e Maxwell, 1987). Após a introdução do electroejeculador, no recto do animal, pressiona-se contra a pélvis, aplicando-se estímulos eléctricos curtos com uma duração de 3-8 segundos e com intervalos entre descargas de 15 a 20 segundos (Evans e Maxwell, 1987; Guerreiro, 2002). Após vários estímulos as secreções das glândulas anexas fluem, seguindo-se o sémen. Quando se obtém inicialmente uma grande quantidade de plasma seminal, este deve ser eliminado de modo a garantir uma menor diluição do sémen. Há uma variação considerável entre os machos na quantidade de estímulo necessária para produzir uma ejaculação satisfatória (Evans e Maxwell, 1987). No entanto, apesar das contracções e desconforto muscular provocado pelas descargas durante as recolhas é de salientar que não permanecem lesões no animal.

2.7.2. Recolha por Vagina Artificial

O método de recolha de sémen por vagina artificial é o mais utilizado em caprinos, apesar de implicar o treino dos bodes para saltarem na cabra ou no manequim e ejacularem dentro da vagina artificial.

A recolha por vagina artificial requer por parte do técnico várias horas de trabalho e deste modo alguma paciência. É preferível começar na época reprodutiva (Verão e Outono em raças sazonais) e em animais jovens, assim que atingem a puberdade. É importante que seja sempre a mesma pessoa a realizar o trabalho, desde do treino dos animais até a futuras recolhas de sémen. Do mesmo modo, os animais devem iniciar o treino no local onde futuramente serão efectuadas as recolhas. Nos caprinos recorre-se, por vezes, a caixas individuais que permitem a imobilização da fêmea e consequentemente facilitam o método de recolha de sémen aquando do salto do macho (Baril *et al.*, 1993).

Os manequins mecânicos podem tornar-se mais vantajosos do que os vivos, na medida em que proporcionam maior estabilidade aquando da recolha e previnem o controlo de doenças entre os animais (Evans e Maxwell, 1987). Com manequins vivos é necessário garantir que não ocorram movimentos laterais e para a frente, evitando perdas de sémen.

É fundamental que no momento da recolha a fêmea evidencie algum tipo de comportamento característico de manifestação de cio. As fêmeas podem ser usadas inteiras recorrendo ao cio natural ou induzido pela aplicação de tratamento hormonal. Fêmeas castradas podem ser igualmente utilizadas, recorrendo à aplicação de tratamento hormonal para induzir o comportamento de cio. O comportamento de estro consegue-se com 3, 2 ou apenas 1 injeção por semana de 100µg de benzoato de estradiol (Baril *et al.*, 1993).

A vagina artificial é uma imitação da vagina da fêmea, apresentando as condições necessárias à manutenção da ereção e conseqüente ejaculação, ou seja simulação das condições térmicas e estimulação mecânica (pressão) da vagina natural (Muniz, 2003; Maia, 2010). As vaginas artificiais são semelhantes variando apenas no comprimento e diâmetro em função da espécie alvo. A vagina de caprinos deve compreender as seguintes medidas 15cm x 5.5cm. Devem ser feitas de borracha forte, plástico ou outro material sintético, com boas propriedades de isolamento e revestimento interior (Evans e Maxwell, 1987).

2.7.2.1. Preparação da Vagina Artificial

Antes de se iniciar o processo de recolha o técnico deve verificar se o material foi devidamente limpo na última utilização. A vagina deve ser totalmente desmontada para que se possa desinfectar cada uma das peças da mesma separadamente. Este

processo deve ser efectuado depois de cada utilização, lavando e enxaguando com água destilada.

É fundamental que a vagina artificial se encontre devidamente montada para garantir a pressão e temperatura adequadas. Na montagem da vagina artificial, a manga de borracha deve ser sempre maior que o tubo cilíndrico rijo, de modo a garantir que quando colocada no interior deste seja dobrável para o exterior do mesmo tubo, permitindo assim formar um depósito estanque para a água, depois de devidamente apertado por elásticos em ambas as extremidades do cilindro.

O técnico antes de efectuar a recolha de sémen deve desinfectar a vagina artificial enxaguando, todo o revestimento da mesma, com álcool a 70% em água destilada e deixar secar. A vagina entre cada recolha deve estar limpa, seca e esterilizada. De seguida, o revestimento é cheio até meio com água a 48-50°C por uma torneira montada na parte lateral, com o auxílio de um funil ou de uma seringa (a água quente ajudará o excesso de álcool a evaporar). No entanto, deve-se ter cuidado para que a água não entre na manga de borracha, o que poderia causar a morte dos espermatozóides. O ar insuflado para o interior da vagina deve ser numa quantidade que permita a fácil penetração do pénis. Depois de verificada a temperatura e a pressão encaixa-se no lado maior da vagina o tubo de borracha acoplado ao tubo graduado e coloca-se dentro de uma capa isoladora, de modo a evitar oscilações de temperatura e consequentes choque térmicos (Guerreiro, 2002). A pressão ideal requerida por cada macho apenas se pode saber por experiência (Evans e Maxwell, 1987). Por fim, lubrifica-se a outra extremidade da vagina com gel estéril ou vaselina, de modo a facilitar a penetração.

A temperatura da vagina artificial um pouco antes da recolha de sémen deve estar a 42-45°C e pode ser confirmada pela introdução de um termómetro estéril. Se a

vagina estiver muito fria deve ser adicionada água mais quente do que a inicialmente utilizada. Para evitar o choque térmico dos espermatozóides os tubos de recolha devem estar aquecidos a 30-37°C. Nos climas mais frios, onde é difícil manter a temperatura da vagina artificial nos 42-45°C, pode-se mantê-la por um curto espaço de tempo dentro de uma incubadora a 37°C, antes de enchê-la de água (Evans e Maxwell, 1987)

2.7.2.2. Técnica de recolha com Vagina Artificial

A fêmea na altura da recolha de sémen não deve apresentar pêlo comprido nem sujidade na parte traseira. A recolha de sémen é feita com o técnico agachado no lado direito da fêmea, com a vagina artificial na sua mão direita junto ao flanco da fêmea. A vagina artificial na mão do técnico deve tomar uma posição de 45°, dirigida para o pénis do macho e ligeiramente inclinada para baixo (Evans e Maxwell, 1987; Sousa, 2000). O tubo de recolha deve ser mantido parcialmente quente pela mão que o segura (Evans e Maxwell, 1987).

O técnico deve estar atento, pois geralmente após a entrada do macho na sala de recolha inicia-se um comportamento de côrte seguido quase de imediato por um salto repentino (Evans e Maxwell, 1987). Aquando do salto o técnico deve desviar o pénis com a mão esquerda para o interior da vagina artificial. Imediatamente após a recolha o tubo deve ser identificado e colocado em banho-maria a 30-33°C, evitando-se assim os choques térmicos e as contaminações.

Deve ser dada especial atenção aos hábitos individuais de cada macho, de modo a corrigi-los e prepará-lo para recolhas com vagina artificial. Assim, consegue-se diminuir o número de saltos em falso e reduzir a frustração dos animais e do técnico. O técnico também deve ter reflexos rápidos para não perder a ejaculação aquando da montagem rápida dos bodes.

Ocasionalmente, pode observar-se nalguns bodes a ejaculação retardada. Neste caso, o sémen não é expelido a partir do tracto genital durante o primeiro impulso, mas apenas depois de o animal desmontar (Evans e Maxwell, 1987). Esta perturbação a nível do mecanismo ejaculatório pode ser causada pela flexão do pénis durante a recolha ou preparação incorrecta da vagina artificial. Machos muito excitáveis ou que foram retirados e estimulados por muito tempo antes de montar podem levar a uma ejaculação precoce.

A frequência com que o sémen pode ser colectado depende da idade, condição e temperamento do animal. Os bodes podem ejacular 10 a 15 vezes ou mais num dia. Quanto maior o número de ejaculados, menor o volume e a concentração do sémen e, consequentemente, o número de espermatozóides por ejaculado. No entanto, um programa de recolhas com 3 a 5 colheitas diárias durante 4 a 5 dias, separadas por 2 a 3 dias de repouso não devem causar uma redução acentuada na qualidade ou quantidade de sémen (Evans e Maxwell, 1987). Nos bodes, é normal efectuar-se 2 a 3 recolhas diárias em dias alternados. No entanto, é indispensável que o intervalo entre recolhas seja de meia a uma hora para obtenção de um bom ejaculado, tanto em volume como em concentração (Evans e Maxwell, 1987).

2.7.3. Selecção dos Machos Dadores de Sémen

Na escolha dos machos dadores devem ser examinados os órgãos reprodutores, nomeadamente o tamanho e a forma dos testículos. A palpação pode ser feita no escroto. Os testículos devem ser firmes e elásticos, sem lesões ou deformações, e mover-se livremente no saco escrotal. As caudas do epidídimo devem ser facilmente palpáveis e com igual forma e tamanho. Se o epididimo inchar ou endurecer nalguma zona devido a lesão ou doença pode suspeitar-se de epididimite (Maia, 2010). Também

se deve ter em atenção a integridade do ducto deferente, que deve ser duro e facilmente palpável. Por fim, deve ser analisado o prepúcio, o pénis e, particularmente, o processo uretral devem ser analisados no aparecimento de anomalias (Evans e Maxwell, 1987). O processo uretral pode ser danificado aquando da tosquia (Evans e Maxwell, 1987). Animais que têm defeitos como criptorquidia (testículos que não desceram da cavidade abdominal para o escroto), hipoplasia testicular (testículos subdesenvolvidos), spermioestase (bloqueio dos canais do epidídimo) ou varicocele (dilatação veia espermática) devem ser excluídos do programa de inseminação. Por vezes na selecção do macho é negligenciada a sua capacidade de salto e vigor sexual. Estes aspectos podem ser observados aquando da exposição do macho perante a fêmea em cio. A dificuldade em efectuar o salto pode dever-se a traumas físicos como artrite, pieira ou lesões no pénis. Também é influenciada pelo temperamento e conduta sexual do macho. Em última análise, é fundamental que o macho seleccionado produza sémen de boa qualidade e quantidade.

2.7.4. Preparação dos Machos Dadores de Sémen

Os machos podem manifestar esterilidade transitória devido a várias condições de stress, como por exemplo a temperatura ou humidade elevadas, a mudança de ambiente, de dieta entre outros factores. Deste modo, tratamentos para combater o stress devem ser efectuados com antecedência de, pelo menos, 6 a 8 semanas antes do programa de recolha (Maia, 2010). Deve observar-se se alguns procedimentos de rotina são factores de stress para o animal, como por exemplo o corte de cascos. Também o transporte dos animais é um factor causador de stress, pelo que deve ser efectuado com alguma antecedência, para que seja possível a adaptação a um novo ambiente e dieta.

Tem sido demonstrado que a administração de concentrados com valores de proteína altos pode aumentar a produção de espermatozoides (Evans e Maxwell, 1987). Desta forma, a nutrição dos bodes deve ser melhorada 6-8 semanas antes da recolha de sémen. Neste contexto, poderá ser necessária a separação dos animais para a alimentação, o que lhe permitirá tomar conhecimento com um novo espaço. Um dos suplementos alimentares utilizados nestas situações é o grão de tremço numa quantidade de 500 a 750 g/animal/dia. Se o animal tiver a necessidade de se manter por um período mais longo com uma alimentação diferenciada é aconselhável seguir recomendações dietéticas.

Um dos factores mais importantes no controlo da qualidade e quantidade de sémen é a época em que se efectua a recolha. O sémen é de melhor qualidade quando recolhido na época reprodutiva. Este factor é particularmente importante nas raças sazonais. Deste modo, as recolhas de sémen devem ser planeadas de forma a coincidirem com a época reprodutiva. No caso de o sémen ser necessário fora da época reprodutiva deve ser armazenado congelado até à sua utilização.

2.7.5. Treino dos Machos Dadores de Sémen

O método de recolha de sémen mais adequado é a vagina artificial. Este método de recolha exige que os animais dadores sejam treinados com 2 a 3 semanas antes de iniciarem os programas de recolhas de sémen. Durante o período de treino o técnico consegue determinar a qualidade do sémen, o que lhe permite recorrer a bodes com maior valorização seminal antes de dar início ao programa de recolha propriamente dito. Os machos depois de treinados para as recolhas de sémen podem ser utilizados em recolhas mais espaçadas no tempo, uma vez que reaprendem facilmente a ejacular na vagina artificial (Evans e Maxwell, 1987).

O treino consiste em desenvolver um efeito de reflexo condicionado no macho, para que salte aquando da presença da fêmea e do técnico num ambiente confinado. Ao mesmo tempo o técnico toma conhecimento individual do temperamento e comportamento de cada um dos machos. Para que ocorra estimulação sexual por parte do macho é fundamental estabelecer-se um contacto visual e o olfactivo com a fêmea, tal como a observação de outros machos a saltarem.

O treino dos bodes dadores de sémen deve seguir 4 passos básicos. O primeiro passo para dar início ao treino do animal para recolhas de sémen por vagina artificial deve consistir na mobilização do macho para o local onde habitualmente serão feitas as recolhas, por um período de 5 a 10 dias, de modo a que o animal tome conhecimento do ambiente. O passo seguinte é a introdução de fêmeas em cio para estimular o salto do macho. Depois o macho deve ser acostumado a saltar com a fêmea presa a uma manga de recolha ou a um local destinado à mesma finalidade. Este passo deve sempre ser feito na presença do técnico. Se o macho é deixado sozinho com a fêmea e não demonstra nenhum interesse, deve ser retirado e reintroduzido novamente por curtos períodos de tempo. Cada vez que o macho é colocado em contacto com a fêmea recebe um novo estímulo. Por fim, os machos que têm por hábito saltar e cobrir a fêmea devem ser acostumados de imediato a ejacular no interior da vagina artificial.

O tempo necessário para treinar um bode dador de sémen depende do técnico, bem como da experiência sexual e temperamento dos animais. O manuseamento e familiaridade a que os animais estão acostumados com os humanos é um factor importante. Explorações que têm os animais alojados em infraestruturas são mais fáceis de treinar uma vez que estão familiarizados com o ambiente local. Normalmente, os animais mais jovens são mais tímidos do que os mais velhos, e os bodes tendem a ser mais sensíveis a saltar na presença de humanos.

O técnico deve ser uma pessoa paciente e gentil porque os animais em formação são particularmente sensíveis à distração ou a sustos provocados por técnicos impacientes e a presença de outros animais como cães e estranhos. Um susto durante o período de treino pode ter efeito inibitório prolongado no desempenho do animal. Os técnicos devem observar as características comportamentais de cada macho, de modo a garantir que os animais mantêm uma produção de sémen de qualidade e quantidade adequadas após a recolha com vagina artificial.

2.8. Avaliação do Sémen

Após a recolha de sémen, a quantidade e qualidade de cada ejaculado deve ser cuidadosamente avaliada. O manuseio do sémen deve ser feito cuidadosamente para que a viabilidade dos espermatozóides não seja afectada.

Existem vários factores que afectam a viabilidade dos espermatozóides após a recolha do sémen. Deve garantir-se que o sémen não é exposto a condições desfavoráveis durante ou após a recolha (Evans e Maxwell, 1987). E que após a última recolha todo material foi devidamente limpo, esterilizado, seco e quente a 30°C, especialmente nos dias frios. Uma zona limpa pode ser transformada numa laboratório de campo para que se proceda à manipulação e exame rápido do sémen. Esta área deve conter uma mesa ou bancada e espaço suficiente para o equipamento, tal como microscópico, banho-maria, entre outras coisas.

Após a recolha, o sémen deve ser colocado em banho-maria a 37°C. Do mesmo modo, o material utilizado no processo de avaliação deve estar aquecido a 37°C. Para isso, deve ser colocado sobre uma placa aquecedora ou numa estufa, diminuindo assim as variações térmicas dos espermatozóides (Muniz, 2003).

Os ejaculados dos bodes variam em quantidade e qualidade. A quantidade de espermatozóides por ejaculado depende da concentração e volume de sémen. Os parâmetros para avaliar a qualidade do sémen são a motilidade e a morfologia dos espermatozóides. Estas características, bem como a cor e o cheiro do sémen devem ser analisados logo após a recolha.

2.8.1. Avaliação Macroscópica

2.8.1.1. Cor, Cheiro e Aspecto do Sémen

A cor do sémen é o primeiro parâmetro a ser avaliado. A avaliação deve ser feita por observação directa no tubo de recolha imediatamente a seguir à recolha de sémen (Fig. 5). A cor normal do sémen de bode é branco-acinzentado a amarelado, variando entre ejaculados do mesmo macho entre prata e branco (Maia, 2010). Se o sémen apresentar uma tonalidade rosada poderá indicar presença de sangue, que pode ser devido a lesões do pénis durante a recolha (Muniz, 2003). As tonalidades cinza e castanho são indicativas de contaminação ou alguma infecção no tracto reprodutivo (Maia, 2010). Também podem ocorrer casos em que se observe a presença de urina através do odor. Esta possibilidade é evidente após recolhas de sémen por electroejaculação (Evans e Maxwell, 1987). Se existir urina no sémen este apresenta-se mais diluído e conseqüentemente com uma coloração menos intensa (Guerreiro, 2002). No que concerne ao aspecto deve variar de leitoso a cremoso (Quadro 1), eliminando-se sempre o sémen aquoso ou turvo, dado que é indicativo de uma pequena concentração espermática (Muniz, 2003).

Quadro 1 - Concentração Sémén Avaliado pela Consistência

Escala / Pontuação	Consistência	Nº spz (x10 ⁹)/ml	
		Média	Desvio da Média
5	Densa e Cremosa	5.0	4.5-6.0
4	Cremosa	4.0	3.5-4.5
3	Pouco Cremosa	3.0	2.5-3.5
2	Leitoso	2.0	1.0-2.5
1	Turvo	0.7	0.3-1.0
0	Aquoso	Insignificante	

Fonte: Baril et al. (1993)

2.8.1.2. Volume do Ejaculado

A medição do volume de sémén pode ser efectuada por leitura directa nos tubos de recolha graduados (Fig. 5), ou de forma mais precisa com uma pipeta calibrada (Evans e Maxwell, 1987; Baril *et al.*, 1993). A leitura é feita excluindo a parte espumosa que se forma na parte superior do tubo após a colheita (Baril *et al.*, 1993). Quando a recolha de sémén é efectuada por vagina artificial o volume médio dos ejaculados varia entre 1 a 1,5 ml dependendo da raça, idade, condição do animal, frequência com que são efectuadas as recolhas e da habilidade do técnico (Evans e Maxwell, 1987; Baril *et al.*, 1993). No entanto, segundo Traldi (1994) o normal de um ejaculado de bode varia entre 0,5 a 2 ml de sémén, sendo caracterizado por uma concentração espermática de 1 a 5 biliões de espermatozóides, com aspecto cremoso e

uma coloração branco-marmórea. Animais mais jovens ou em mau estado, nomeadamente sanitário, produzem volumes de ejaculado mais pequenos (Guerreiro, 2002). O volume do ejaculado diminui gradualmente com o número de recolhas sucessivas. No caso de a recolha de sémen ser efectuada por electroejaculação, o volume de sémen depende da habilidade do técnico, bem como da capacidade de resposta do macho.



Figura 5 - Avaliação das Características Seminais por Observação Directa

Adaptado: Foto do autor

2.8.2. Avaliação Microscópica

2.8.2.1. Mobilidade

A avaliação do movimento de ondas é o teste mais simples que se efectua para observar a motilidade do sémen fresco. A avaliação da motilidade pode ser efectuada de duas formas distintas, pelas características de movimento de onda do sémen ou pela percentagem de espermatozóides progressivamente móveis na amostra. A avaliação da percentagem de espermatozóides progressivamente móveis deve ser feita quando o sémen é diluído, ou após congelamento e descongelamento (Maia, 2010).

2.8.2.1.1. Características dos Movimentos das Ondas

Quando observado ao microscópico o sémen do bode exhibe movimentos ondulatórios, que permitem determinar a mobilidade massal (Evans e Maxwell, 1987; Sousa, 2000). A observação dos movimentos de onda deve ser imediata, uma vez que decrescem rapidamente com o passar do tempo. Em alguns casos, decresce entre 15 a 20 segundos (Guerreiro, 2002). Técnicos experientes e com boa capacidade de visualização conseguem observar no tubo de recolha a olho nu os movimentos de onda, no entanto é indispensável a sua observação precisa ao microscópio. Para observação microscópica coloca-se uma gota de sémen puro numa lâmina limpa e aquecida a 37°C sem lamela, a uma ampliação baixa (40x ou 100x). Para garantir a temperatura da lâmina aquando da observação recomenda-se utilizar a platina aquecedora.

Se o movimento de ondas não for observada, é efectuada uma estimativa da motilidade dos espermatozóides sobre a energia dos movimentos de onda ou da sua actividade em geral. Esta técnica é suficiente para determinar quais os ejaculados com maior número de espermatozóides mortos e baixa mobilidade, mas no entanto não

permite determinar a percentagem de espermatozóides móveis e motilidade individuais (Guerreiro, 2002) A avaliação geralmente é efectuada por um sistema de pontuação numa escala de 0-5 (Quadro 2). Embora este método de avaliação seja subjectivo, com a prática torna-se mais precisa a pontuação atribuída à motilidade espermática.

Apenas devem ser utilizadas para inseminação artificial as amostras que obtiverem uma pontuação de 4 ou 5, de modo a não comprometer o sucesso da inseminação (Sousa, 2000).

Quadro 2 - Determinação da Motilidade Massal

Escala / Pontuação	Descrição dos Movimentos de Onda
5	Ondas muito rápidas e densas que se juntam formando um redemoinho (difícil determinar ondas isoladas). 90% ou mais de espermatozóides vivos.
4	Ondas rápidas e vigorosas, não forma redemoinho. 70 a 85% de espermatozóides ativos.
3	Ondas de baixa amplitude e movimento lento. 45-65% de espermatozóides ativos.
2	Observam-se os movimentos espermáticos, mas não forma ondas. 20-40% de espermatozóides ativos.
1	Apenas movimento individual de poucos espermatozóides. \pm 10% de espermatozóides vivos.
0	Totalmente sem movimento.

Fonte: Chemineau *et al.* (1991)

2.8.2.1.2. Proporção Espermatozóides Móveis

Este método é utilizado para amostras de sémen que foram diluídas e que podem ter diminuído a motilidade após o armazenamento. Nestes casos, deve recorrer-se a uma ampliação maior (400x) para observar os espermatozóides individualmente. A fase de aquecimento do microscópico deve estar ligada para garantir a temperatura óptima de sobrevivência dos espermatozóides. O técnico deve observar os vários campos da lâmina e avaliar de forma percentual os espermatozóides que são progressivamente móveis e que apresentam movimentos rectilíneos. Se a concentração espermática for elevada que não possibilite uma observação individual dos espermatozóides, deve proceder-se a uma diluição gradual até conseguir-se um bom plano de visualização dos mesmos. No entanto, é de realçar que quanto menor for o factor de diluição, menor a margem de erro em qualquer avaliação espermática que se efectue.

Existem aparelhos mais sofisticados para determinar a motilidade do que os anteriormente referidos. Estes podem, por exemplo, projectar a imagem do microscópio numa tela e posteriormente utilizá-la como fotografia. Quando estas imagens são processadas por computador, estima-se de forma precisa o número de espermatozóides móveis e os seus movimentos de onda. No entanto, este tipo de equipamento é caro e não é móvel. Na prática, os métodos de avaliação acima descritos são suficientemente adequados para programas de inseminação artificial em caprinos e ovinos.

2.8.2.2. Concentração

O objectivo da medição da concentração do ejaculado é determinar o número de espermatozóides por ml de sémen puro de modo a gastar o mínimo de sémen possível. Após a determinação do volume e da concentração é possível calcular o factor de diluição do sémen (Barril *et al.* , 1993; Sousa, 2000). A concentração espermática varia

geralmente entre 2 e 10×10^9 espermatozoides por ml de sémen ejaculado. Segundo Gonçalves *et al.* (2001), o valor normal encontra-se em torno dos 3 bilhões/ml de sémen. Mas segundo Evans e Maxwell, 1987, o sémen de bode de boa qualidade contém 2,5 a 5×10^9 espermatozoides/ml. Existem várias formas de medir a concentração: visualização directa da consistência do ejaculado, contagem exacta com um hemocitómetro e medida da densidade óptima através de um espectrofotómetro, podendo ainda ser utilizado um contador ou electrónico de partículas (Coulter).

2.8.2.2.1. Visualização Directa da Consistência do Ejaculado

A apreciação visual directa da concentração espermática (Fig. 5) é uma das técnicas utilizadas por vários centros de inseminação. Esta prática nem sempre é recomendada uma vez que a apreciação é subjectiva.

2.8.2.2.2. Contagem exacta com um Hemocitómetro

A contagem exacta do número de espermatozoides através de hemocitómetro é o método mais preciso para determinar a concentração, se efectuado com rigor. O principio desta medição é a contagem do número exacto de células espermáticas presentes num determinado volume de uma solução de diluição conhecida. A maioria dos hemocitómetros é composta por duas grelhas. Cada uma é dividida em 16 quadrados maiores que se subdividem em outros 16 quadrados mais pequenos (Fig. 6) com uma área de $1/400 \text{ mm}^2$. A altura (distância) entre a lâmina e a lamela tem um valor constante de $1/10 \text{ mm}$ e o volume de $1/4000 \text{ mm}^3$ em cada quadrado pequeno (Baril *et al.*, 1993).

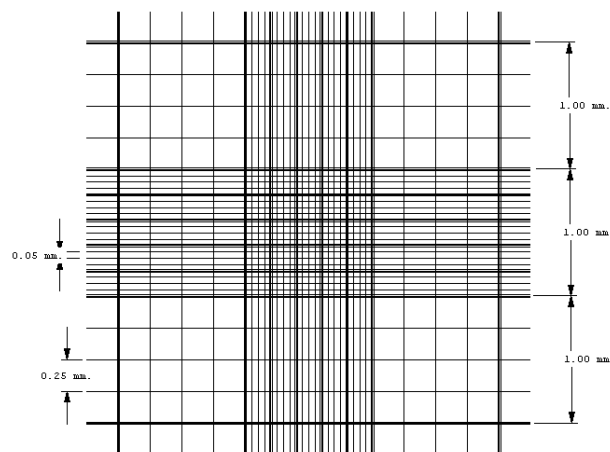


Figura 6 - Grelha de Contagem do Hemocítmetro

Adaptado: http://www.protocolosbiomed.com.br/page_19.html

Para se proceder à avaliação do sémen, este deve ser diluído numa solução espermicida, por exemplo uma solução salina a 3% ou em soro fisiológico formilado (Sousa, 2000). A diluição para ser precisa deve conter 0,01 ml de sémen puro misturado em 4 ml de solução formilada salina (0,9% de cloreto de sódio e 0,1% de formaldeído em água destilada), para homogeneizar a solução. A preparação da câmara de Neubauer deve ser efectuada com o auxílio de uma pipeta. Para fixar melhor a lamela à lâmina, deve colocar-se uma gota de água em cada uma das laterais da lamela. A pipeta, também, serve para colocar uma gota do sémen diluído, sem bolhas de ar, no bordo do hemocítmetro, entre a lâmina e a lamela. Assim, a gota espalhar-se por capilaridade na câmara de Neubauer. De seguida deixa-se repousar a placa para que haja sedimentação dos espermatozóides no fundo da lâmina (Baril *et al.*, 1993). Por fim, coloca-se o hemocítmetro, cuidadosamente, no microscópio. Este deve conter um mecanismo de precisão que permita a visualização em duas direcções e contraste de fase.

No microscópio de contraste de fase, deve iniciar-se a observação a uma potência baixa (40x ou 100x) de modo a detectar a grade de contagem, passando-se posteriormente para uma ampliação mais elevada (400x) (Baril *et al.*, 1993; Maia,

2010). A contagem deve ser efectuada sobre o 5 quadrados maiores, numa linha diagonal. Apenas se devem contar os espermatozóides que têm as cabeças dentro dos quadrados grandes, sendo assim eliminados os que apresentarem as cabeças sobre a linha do quadrado no sentido interior exterior (Sousa, 2000). A concentração espermática calcula-se pela soma da contagem diagonal dos 5 quadrados maiores multiplicando por 50×10^6 spz/ml. Esta técnica é muito precisa para determinação da concentração espermática. No entanto, requer bastante tempo e paciência, e não deve ser efectuada como método de rotina por um centro de inseminação artificial (Baril *et al.*, 1993).

2.8.2.2.3. Densidade Óptima através de um Espectrofotómetro

Existem vários modelos de colorímetros disponíveis (Evans e Maxwell, 1987), no entanto o método mais rápido e eficaz para determinar a concentração espermática é a utilização do espectrofotómetro. Esta técnica baseia-se na medição da densidade óptica, a um comprimento de onda de 550 nanómetros, de uma solução salina contendo espermatozóides, com uma amostra "branca" sem espermatozóides. Se esta técnica for utilizada de forma rotineira, é necessário obter uma curva de calibração utilizando 20 a 50 amostras de concentrações diferentes de espermatozóides, a partir da contagem do hemocitómetro (Baril *et al.*, 1993).

A correlação e o declive da linha de regressão são calculados entre a densidade óptica da amostra (x) e a sua concentração espermática (y). Ou seja, quanto maior a densidade espermática menor o feixe de luz transmitido pela amostra (Baril *et al.*, 1993; Sousa, 2000). O coeficiente de correlação deve ser superior a 0,9 e o declive próximo de 1. Deste modo, um diagrama, ou a mesma fórmula podem ser utilizadas como método de rotina.

Nos carneiros o sémen diluído a uma taxa normal, apresenta uma relação inversa entre a quantidade de luz transmitida e o número de espermatozóides da amostra. No entanto, para os bodes a mesma situação não ocorre devido à coloração mais amarelada do sémen devido ao plasma seminal que interfere na transmissão da luz (Evans e Maxwell, 1987). O colorímetro deve ser calibrado com 10 a 15 contagens efectuadas pelo hemocítmetro, de modo a obter uma curva de calibração. Para a calibração, deverão ser utilizadas várias amostras de sémen de diferentes concentrações.. A precisão do colorímetro deve ser verificada ao longo do tempo através de comparações com as contagens do hemocítmetro. O sémen diluído 100x com uma solução salina de 0.9% possibilita uma leitura na gama mais sensível do colorímetro.

2.8.2.3. Morfologia dos Espermatozóides

O exame morfológico dos espermatozóides é um teste detalhado que nos permite avaliar a qualidade do sémen. Os ejaculados apresentam alguns espermatozóides anormais, normalmente 5 a 10% (Evans e Maxwell, 1987; Maia, 2010). As amostras com elevada percentagem de espermatozóides anormais, ou seja com valores superiores a 20-25%, traduzem uma taxa de fertilidade baixa (Evans e Maxwell, 1987; Maia, 2010). A percentagem de espermatozóides anormais varia em função da época do ano, da temperatura ambiental, idade, nutrição, doença e qualquer factor causador de stress. Durante a rotina de processamento de sémen, não é realizada a avaliação morfológica de cada ejaculado, devido ao tempo necessário para executá-la (Maia, 2010). Normalmente, esta avaliação é feita durante o exame andrológico para selecção de dadores e repetida mensalmente. O método mais utilizado para avaliação da morfologia espermática é microscopia de contraste fase e microscopia de campo claro, em amostras submetidas à coloração.

2.8.2.3.1. Percentagem de Espermatozóides Vivos e Anomalias Morfológicas

O método mais utilizado para determinar a percentagem de espermatozóides vivos e as suas anomalias morfológicas é por coloração diferencial. Estes métodos dividem-se em vitais, se tiverem por finalidade determinar a percentagem de espermatozóides vivos, e totais se, para além de determinarem a percentagem dos espermatozóides vivos, avaliam as anomalias morfológicas (sousa, 2000).

Os espermatozóides anormais são detectados em esfregaços e corados numa lâmina sendo possível examinar cada ejaculado no campo durante um programa de inseminação artificial. Contudo, é fundamental observar o sémen, previamente às recolhas, se os animais foram recentemente introduzidos no local ou caso manifestem outros sintomas de stress que possam afectar a qualidade do sémen. Também é aconselhável durante o decorrer do programa de inseminação a verificação periódica da qualidade do sémen dos bodes dadores (Evans e Maxwell, 1987).

O método mais utilizado para determinar a percentagem de espermatozóides vivos e normais é por coloração com eosina-nigrosina. Esta teste é baseado na permeabilidade do acrossoma à eosina, ou seja, os espermatozóides mortos na altura da coloração apresentam o acrossoma, total ou parcialmente, rosado ou vermelho (Baril *et al.*, 1993). Aparecem também espermatozóides parcialmente corados (apenas com metade da cabeça corada), estes devem ser incluídos no número de mortos. Segundo Maia (2010), alguns autores consideram estas células como moribundas ou que morreram recentemente. Segundo Evans e Maxwell (1990), os reprodutores que apresentarem mais de 20-30% dos espermatozóides mortos, e mais de 15-20% anormais, não devem ser utilizados nos programas de inseminação artificial.

Para além do método anteriormente referido, existem outras técnicas para determinar a percentagem de espermatozóides vivos e normais, tais como o teste de azul de bromofenol-nigrosina, azul de metileno, rosa Bengala, entre outros.

Para contabilizar a percentagem de espermatozóides vivos é necessário observar diferentes campos na mesma lâmina e contar no mínimo 150 espermatozóides (Baril *et al.*, 1993). Após estas contagens é possível determinar as respectivas percentagens de espermatozóides vivos e mortos.

2.8.2.3.1.1. Preparação do Esfregaço

Para uma observação adequada das preparações coloridas é fundamental que esta seja bem executada. Na preparação do esfregaço deve utilizar-se uma lâmina previamente aquecida a 37°C. Coloca-se numas das extremidades da lâmina 1 a 2 gotas de corante e uma gota de sémen diluído separadamente. As gotas devem atingir a mesma temperatura da lâmina antes de se misturarem (Evans e Maxwell, 1987). As gotas misturam-se com o auxílio de uma lamela ou lâmina durante aproximadamente 10 segundos. De seguida estende-se a mistura ao longo da lâmina, de modo a obter uma película fina sobre a mesma. Antes de se observar a amostra, a 400x, deve-se garantir que a mesma se encontra seca. Depois identifica-se a lâmina com o número do animal. O esfregaço pode ser conservado num ambiente seco ou dentro de um saco fechado e etiquetado. Assim, a amostra conserva-se durante vários meses sem alterações.

2.8.2.3.1.2. Anomalias Morfológicas

Como já foi referido, anteriormente, a maioria dos ejaculados apresenta espermatozóides anormais. Estas anomalias podem ser divididas em várias classes

consoante o seu grau de deficiência. Na primeira classe estão incluídos os espermatozóides que adquiriram anomalias aquando da espermatogénese. Na segunda os espermatozóides que ganharam anomalias na passagem do epidídimo, e na terceira aqueles que as suas anomalias ocorreram durante ou depois da ejaculação.

Nas anomalias primárias incluem-se todos os espermatozóides que apresentam cabeça, acrossoma, cauda e peça intermediária com malformação. Na segunda e terceira categoria estão incluídas os espermatozóides que apresentam cabeças soltas, gota citoplasmática, caudas enroladas e separação do acrossoma (Baril *et al.*, 1993; Sousa, 2000).

Os diferentes tipos de anomalia variam um pouco em função da espécie animal que se observa. Nos caprinos, tal como nos outros pequenos ruminantes, as anomalias mais comuns são: espermatozóides sem cauda, com anomalias nas cabeças (com acrossoma anormal, cabeças pequenas, estreitas, grandes ou largas), com deficiências na cauda (enrolada, partida, entre outras), e com a presença de gotas citoplasmáticas (Baril *et al.*, 1993).

2.8.2.4. Técnicas de Avaliação de Sémen *in Vitro*

Tradicionalmente, a avaliação de sémen baseia-se em parâmetros como o volume, aspecto e determinação da concentração, que consiste na observação da motilidade e morfologia espermática num microscópio de luz convencional. Contudo, estes métodos não deixam de ser subjectivos. Nos últimos anos tem-se reunido esforços no sentido de melhorar a avaliação seminal, o que levou ao aparecimento de técnicas de avaliação *in vitro*. Estas técnicas permitem um conhecimento mais detalhado de várias características espermáticas.

A avaliação do sémen *in vitro* permite determinar a capacidade reprodutiva de um macho como reprodutor, além de complementar informações obtidas durante a realização do exame clínico. Esta contribuição passa pela avaliação da função testicular, epididimária e de todo o sistema reprodutor do macho. Para além destes parâmetros, é importante para determinar o grau de normalidade das células espermáticas antes de serem processadas para o uso na inseminação artificial.

Uma das técnicas *in vitro* que tem tido maior desenvolvimento é a coloração fluorescente que permite ter uma análise mais ampla da qualidade do sémen a vários níveis, tais como ultra-estrutural, funcional e bioquímico (Vidigal, 2008; Batista, 2010). Deste modo, muitas sondas fluorescentes têm sido utilizadas isoladamente ou em combinação para analisar a integridade e a viabilidade espermática com o auxílio da microscopia fluorescente (Batista 2010). No entanto, a análise microscópica apenas quantifica um pequeno número de espermatozóides dentro de uma determinada população de células. Esta técnica associada à citometria de fluxo, permite que as sondas fluorescentes efectuem uma medição mais rápida aos atributos espermáticos em larga escala (Batista, 2010).

A avaliação de sémen por microscopia de luz convencional tem sido, cada vez mais, substituída pelos sistemas de análises computadorizadas. Estes sistemas permitem obter informação mais detalhada sobre várias características da motilidade e da morfometria. Recentemente, têm sido introduzidos testes para avaliar o grau pelo qual os espermatozóides sofrem stress oxidativo (Batista, 2010). Segundo Harrison e Vickers (1990), adaptações às técnicas de coloração com sondas fluorescentes facilitam a visualização dos espermatozóides em microscópio de epifluorescência e o aumento da aplicabilidade da técnica a partir da adição de concentrações baixas de formaldeído para imobilização dos espermatozóides, durante a avaliação.

2.8.2.4.1. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo, permite a observação de determinadas características das células por um sistema de fluxo, permitindo a análise rápida, objectiva e quantitativa de células em suspensão. Esta técnica envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem em uma suspensão líquida, sendo esta particularidade uma das principais diferenças existentes entre a citometria de fluxo e outras técnicas de análise quantitativa, como por exemplo, a microespectrofotometria, que necessitam da fixação de partículas a uma superfície (ex: lâmina).

Segundo Evenson *et al.* (1980), a adaptação do citómetro de fluxo para avaliação espermática teve início no estudo da mensuração do conteúdo de DNA, mas sua aplicação para análise espermática tem aumentado consideravelmente nos últimos 15 anos. A citometria de fluxo é uma ferramenta muito importante para a análise celular, uma vez que permite determinar, em poucos minutos, dados sobre todas as subpopulações celulares de uma amostra. Este factor torna o método de citometria de fluxo ideal para a avaliação de populações heterogéneas, como de espermatozóides (Batista e Guerra, 2010). Por microscopia óptica apenas se conseguem examinar, normalmente, 200 células espermáticas, enquanto que por citometria de fluxo, consegue-se examinar cerca de 30.000 espermatozóides em menos de um minuto. Este sistema automatizado permite ter maior exactidão nos resultados e diminuição no tempo de preparação requerido em outras técnicas fluorescentes. (Arruda *et al.*, 2011). A medição em fluxo permite análises a alta velocidade (ex: 10^2 - 10^3 partículas por segundo) e além disso, garante que as partículas analisadas sejam seleccionadas de toda a população, sem qualquer subjectividade associada.

A análise por citometria de fluxo é objectiva, tem um alto nível de repetibilidade experimental e possui a vantagem de estar apta a trabalhar com amostras de volume

reduzido. Além disso, o citómetro de fluxo tem a capacidade de detectar marcadores por múltiplos fluorocromos associados a um único espermatozóide, o que significa que mais de um atributo espermático pode ser avaliado simultaneamente. A citometria de fluxo permite a observação de características, como tamanho da célula, forma e complexidade interna, assim como qualquer componente ou função do espermatozóide que pode ser detectado por um fluorocromo ou composto marcado com fluorescência.

2.8.2.4.1.1. Estrutura Básica e Funcionamento de um Citómetro de Fluxo

O citómetro de fluxo resultou da aplicação do conhecimento e técnicas, as quais foram independentemente desenvolvidas, como a ciência da computação, tecnologia laser, engenharia eléctrica, matemática, medicina, biologia, biotecnologia, biologia molecular, produção de anticorpos monoclonais, química orgânica e física.

A citometria de fluxo baseia-se no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, óptica, substâncias fluorescentes (fluorocromos), e recursos de informática. É utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas, tais como vários tipos de células, protozoários, bactérias etc. Esta tecnologia é usada para determinar componentes e propriedades de células e organelos celulares que fluem numa suspensão celular.

O funcionamento do citómetro consiste, basicamente, em uma fonte de luz, um sistema de fluxo celular, em componentes ópticos para diferenciar e seleccionar as modificações de luz, em elementos electrónicos para amplificar e processar o sinal resultante e em um computador. Resumindo, é constituído por três sistemas principais designados por: sistema fluídico, sistema óptico e sistema electrónico.

O sistema fluídico consiste na aspiração das células ou partículas de uma suspensão previamente preparada, forçando-as a passar uma de cada vez,

sequencialmente, por uma câmara especial (do inglês “flow cell”). Assim, as partículas ficam envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (do inglês “sheath fluid”) sendo interceptadas por um feixe de laser. Uma vez interceptadas pela fonte de iluminação, dois tipos de fenómenos físicos ocorrem, dispersão da luz e fluorescência, fornecendo informação acerca da célula.

O sistema óptico, inicia-se com uma parte da luz que é dispersada (do inglês “Scatter”) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula. A dispersão da luz tem por base o princípio físico que explica que quando um raio de luz choca contra uma partícula altera a direcção da luz no seu comprimento de onda. As características celulares que contribuem para a dispersão da luz são o tamanho celular, o núcleo, a membrana celular e o material granular do interior da célula (complexidade celular). Além disso, também tem influência na luz dispersada a forma da célula e a sua superfície lisa ou rugosa. No entanto, a luz não se dispersa de igual forma em todas as direcções. Ou seja, a maioria é dispersa directamente para a frente. Sendo assim, a luz que se dispersa frontalmente relaciona-se com o tamanho celular (do inglês “Forward Scatter” FSC), enquanto que, a luz que se dispersa em ângulo recto (do inglês “Side Scatter” SSC) está relacionada com a densidade celular e com a granularidade da célula, não tendo correlação com o tamanho. Corantes fluorescentes específicos (fluorocromos) são utilizados para observar os componentes celulares que se deseja. Assim, as células previamente coradas com fluorocromos, uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com as suas características fluorescentes e são utilizadas para examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células.

Por fim, o sistema electrónico é responsável por converter o sinal óptico num sinal electrónico que, posteriormente, será analisado por um computador.

2.8.2.4.1.2. Processamento das amostras

Para se proceder à leitura da amostra no citómetro é fundamental que esta seja uma suspensão. Algumas amostras necessitam de uma desagregação mais ou menos intensa, por meio de tratamentos mecânicos e enzimáticos. Também se deve ter em conta que a temperatura e o armazenamento podem ter efeito sobre a viabilidade celular alterando desta forma as populações celulares.

2.8.2.4.1.3. Compostos Fluorescentes mais utilizados para a Citometria de

Fluxo

A utilização de sondas fluorescentes, também designadas de fluorocromos, na citometria de fluxo, é fundamental para o desenvolvimento desta técnica. As sondas fluorescentes são um método muito sensível para obter informação acerca da estrutura, função e viabilidade das partículas que se deseja analisar por citometria de fluxo.

É importante não esquecer que quando se utiliza mais do que uma sonda fluorescente, estas devem ter espectros de emissão diferentes para que se possam quantificar de forma separada. No entanto, há situações em que os fluorocromos têm espectros de emissões que se sobrepõem, obtendo-se por isso resultados ambíguos. Por esta razão, os citómetros possuem um sistema informático de compensação ou subtração de sinal. No entanto, é difícil prever teoricamente o grau de compensação, devendo este ser ajustado individualmente.

Os compostos fluorescentes podem marcar os componentes estruturais e funcionais de interesse de diferentes formas, tais como: ligando-se especificamente a esses componentes celulares (são exemplos os fluorocromos que marcam os ácidos nucleicos de cadeia dupla, proteínas ou lípidos). Também podem distribuir-se num compartimento celular específico (exemplo, no núcleo, mitocôndrias ou vacúolos); num

compartimento específico sub-celular em função do seu estado funcional (o compartimento mitocondrial é um exemplo típico) e ser utilizados ligados a anticorpos ou lectinas conjugados com outros fluorocromos (a fluoresceína e a ficoeritrina, são exemplos de dois fluorocromos muito usados para este efeito). Também são utilizados como uma não marcação, ou seja, como marcação negativa. Por exemplo a exclusão do iodeto de propídio (PI) permite avaliar a integridade da membrana.

O primeiro fluorocromo a ser utilizado como marcador foi o FITC. Este é uma molécula pequena, com uma importante afinidade para as proteínas. Por outro lado o FITC é excitado com o azul (488 nm). No entanto, apresenta alguns inconvenientes relacionados com a quantificação. Há que ter em conta, que uma molécula de FITC não é somente excitável pela luz do laser sendo também pela luz que provem de uma molécula de fluorocromo que se encontre muito próxima.

Para estudos de ácidos nucleicos, os fluorocromos mais empregues são o Iodeto de Propídio, o Brómio de Etídio, o Laranja de Acridina, o Hoechst 33342, o Laranja de Tiazol, a Mitramicina e a Cromomicina A3. Os dois primeiros são excitados a comprimentos de onda de 488 nm e unem-se de forma estequiométrica ao ADN de cadeia dupla onde se intercalam entre a dupla hélice. O Laranja de Acridina apresenta o inconveniente de unir-se ao material plástico criando interferências em medições posteriores. O Hoechst e a Cromomicina A3 unem-se de forma específica aos pares de adenina/timina e citosina/guanina, respectivamente.

2.8.2.4.1.4. Aplicações da Citometria de Fluxo

A aplicação da citometria de fluxo é ampla devido à possibilidade do estudo das populações e subpopulações celulares e de componentes intracitoplasmáticos e nucleares. Com a citometria de fluxo é possível analisar o conteúdo de ADN e ARN, definir em que posição do ciclo celular a célula se encontra, analisar cromossomas,

determinar células cancerígenas que apresentem alterações na sua taxa normal de ADN e células que se encontrem em processo de morte celular programada (apoptose) ou em processo de morte celular acidental (necrose).

2.8.2.4.2. Análises Espermáticas Computadorizadas

As análises espermáticas segundo o método convencional de microscopia de luz podem ser influenciados pelo observador, bem como necessitarem de mais tempo para preparação das amostras e respectiva análise, resultando num número espermatozóides mais baixo para avaliação. Deste modo, segundo Batista e Guerra (2010), nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas para avaliar os mesmos atributos espermáticos por sistemas automatizados de alta tecnologia.

O sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis), foi desenvolvido a meados dos anos 80 e proposto como uma ferramenta que poderia substituir a avaliação subjetiva e aperfeiçoar a rotina laboratorial. Isto por ser um método mais preciso e rápido, relativamente à concentração, morfologia e qualidade do movimento das células espermáticas (Silva *et al.*, 2009). Este tipo de sistema tem a capacidade de produzir informação acerca da cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozóides electronicamente digitalizados, bem como a determinação da posição central de cada cabeça espermática. Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação ou wobble (WOB), expressos em percentual; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha recta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP), expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em Hertz; amplitude do deslocamento

lateral da cabeça do espermatozóide (ALH), expresso em micrómetros (Silva *et al.*, 2009; Batista e Guerra, 2010).

Apesar da quantidade de informação que este método nos transmite, não é fácil maximizar a sua utilização dado o elevado custo de aquisição do equipamentos. Deste modo, apenas algumas clínicas especializadas ou instituições de pesquisa adquirem este equipamento Silva *et al.*, 2009. Segundo Matos *et al.* (2008), as diferenças estruturais da célula espermática entre as espécies estudadas são outros factores que determina limitações na expansão do sistema CASA, uma vez que se faz necessário fornecer ao programa informações específicas de cada célula espermática, como tamanho celular, por exemplo, para a eficácia dos resultados. No entanto, segundo Silva *et al.* (2009) o interesse por este sistema tem vindo a aumentar devido à crescente quantidade de estudos que se têm efectuado desde o ano 1987 na fisiologia espermática.

O registo dos dados quantitativos obtidos pelo sistema CASA permite a detecção de súbitas mudanças na cinética espermática. Deste modo, é possível melhorar o uso de novas amostras de criopreservação, refrigeração, bem como de sémen fresco em relação aos tratamentos laboratoriais, como diluidores, crioprotectores, entre outros. Baseado nisto, tem sido sugerido que os procedimentos de congelação e descongelação reduzem a cinética dos espermatozoides caprinos, mensurados objectivamente por métodos computadorizados (Batista e Guerra, 2010).

2.9. Processamento e Conservação do Sêmen

Após a recolha e avaliação do sêmen, este pode ser utilizado de três formas distintas: fresco, quer seja puro ou diluído, refrigerado ou congelado. Consoante a forma de aplicação do sêmen, deve escolher-se o diluidor e efectuar-se a respectiva diluição antes da sua utilização.

2.9.1. Diluição do Sêmen

O principal objectivo da diluição de sêmen é conseguir maior número de doses para inseminação artificial. Caso contrário, apenas se conseguira cobrir uma fêmea por monta natural, a partir da mesma dosagem de sêmen, uma vez que quando um bode cobre uma fêmea apesar de depositado um grande número de espermatozóides apenas são aproveitados 100 a 140 milhões, ou seja, aqueles que conseguem atravessar o cérvix. Deste modo, o limite mínimo para se obter uma taxa de concepção aceitável é de 100 milhões de espermatozóides por cada dose inseminante (Guerreiro, 2002; Maia, 2010). A diluição além de permitir obter a partir de um mesmo ejaculado várias doses inseminantes, confere aos espermatozóides condições de ordem biológica, proporcionando aos espermatozóides nutrientes e pH adequado e favorecendo um ambiente isotónico.

2.9.1.1. Diluidores

Existem vários tipos de diluidores para caprinos, compostos com diferentes ingredientes. No entanto, um bom diluidor deve conter as seguintes propriedades: fornecer nutrientes aos espermatozóides; ter capacidade tampão, para prevenir as mudanças de pH; proporcionar um ambiente isotónico, ou seja, promover a

osmolaridade igual à do plasma seminal; proteger o espermatozóide do choque térmico durante a refrigeração, bem como protege-lo das lesões causadas na membrana plasmática durante a congelação e descongelação e controlar a proliferação microbiana. Ou seja, criar um ambiente que garanta que o espermatozóide não sofre alterações, e deste modo promova uma boa taxa de fertilidade após a inseminação (Maia, 2010).

Os meios mais utilizados para efectuar a diluição do sémen caprino são de dois tipos: sintéticos ou naturais. Os diluentes sintéticos, mais utilizados, para diluição de sémen de bode, para inseminação vaginal ou cervical, contêm como tampão o tris ou o citrato, a glucose ou a fructose como fonte de energia, e a gema do ovo para proteger a membrana dos espermatozoides contra o frio. No entanto, para os caprinos os diluidores devem apresentar uma percentagem de gema de ovo mais baixa, de modo a garantir que não ocorra nenhuma reacção enzimática. Isto porque, o plasma seminal do bode contém uma enzima que coagula com a gema do ovo. Nesta espécie, existem enzimas no plasma seminal que actuam sobre os fosfolípidos do diluidor, formando reacções bioquímicas que libertam compostos tóxicos para os espermatozoides (Baril *et al.*, 1993). A concentração desta enzima varia consoante o macho, sendo mais elevado no sémen que se obtém por electroejaculação.

O diluidor natural, de mais fácil utilização sobretudo em condições de campo (sémen fresco), é o leite de vaca, que pode ser utilizado inteiro, desnatado ou em pó, devendo a quantidade de gema de ovo ser limitada (Baril *et al.*, 1993; Guerreiro, 2002). O diluidor deve ser reconstituído sempre que se efectue inseminação artificial. O leite UHT também pode ser utilizado e apresenta propriedades que permitem uma melhor conservação do sémen.

2.9.1.2. Método de Diluição

A diluição do sémen deve ser feita o mais rápido possível. O diluidor e o sémen devem ser colocados no banho-maria a 30-33°C, devendo permanecer a esta temperatura na altura da diluição (Maia, 2010). O diluidor deve ser colocado antes do sémen, porque a adição do diluidor mais frio que o sémen pode provocar choques térmicos que se traduzem numa redução da fertilidade. A adição do diluidor deve, também, ser sempre efectuada lentamente sobre o sémen, de modo a garantir que os espermatozóides não sofrem alterações e conseqüentemente diminuem a sua motilidade. Depois de adicionado o diluidor ao sémen procede-se à sua agitação, de modo a homogeneizar a solução, e observa-se ao microscópio para comprovar o grau de motilidade dos espermatozóides (Evans e Maxwell, 1987)

2.9.1.3. Volume de Sémen e Número de Espermatozóides utilizados para Inseminação Artificial

Um grande número de inseminações artificiais praticadas no mundo, em particular na espécie ovina na europa central e de leste, são realizadas com sémen não diluído nos minutos que se seguem à recolha do mesmo (Baril *et al.*, 1993). Este método tem bons resultados na fertilidade, mas requer a presença dos machos junto das fêmeas a serem inseminadas. Num centro de inseminação a diluição de sémen é necessária, sendo esta dependente do tipo de inseminação e do número de doses inseminantes necessárias. Assim, para caprinos os volumes de sémen recomendados para inseminação vaginal, cervical e intra-uterina (para cada corno) são respectivamente, 0,30-0,50 ml, 0,05-0,20 ml e 0,05-0,10 ml (Evans e Maxwell, 1987; Guerreiro, 2002).

Para a inseminação artificial em caprinos é necessária uma dose de sémen com maior quantidade de espermatozóides do que em bovinos, devido à anatomia do sistema reprodutor da fêmea. Cada dose de sémen deve conter pelo entre 100 a 200 milhões de espermatozóides por ml (Muniz, 2003; Mascarenhas e Simões, 2005). Segundo Corteel e Leboeuf (1990), não há qualquer vantagem sobre a fertilidade quando o número de espermatozóides é superior a 200 milhões por dose. Estes autores aconselham o uso de 60 milhões de espermatozóides nas cabras de raça Saanen e 100 milhões nas de raça Alpina.

2.9.1.4. Conservação do Sémen

A conservação do sémen permite prolongar a capacidade de fertilização dos espermatozóides, bem como reduzir ou impedir reacções metabólicas. O sémen pode ser conservado líquido ou congelado. O processo de conservação do sémen líquido é feito por arrefecimento até 4-5°C, e é relativamente simples de se efectuar podendo o mesmo ser utilizado na própria exploração. O processo de congelação é mais complexo e dispendioso.

2.9.1.4.1. Sémen Refrigerado

O sémen pode ser conservado recorrendo ao seu arrefecimento desde a sua temperatura ambiente (temperatura da diluição) até 4-5°C ou 15°C, sendo a sua viabilidade máxima de 48 horas (Guerreiro, 2002; Muniz, 2003). Alguns autores referem períodos de conservação de 24 horas, mas segundo Mascarenhas e Simões (2005) os índices de fertilidade das cabras inseminadas decrescem rapidamente a partir

das 6 horas a +4°C. Segundo estes autores, a refrigeração permite manter a capacidade fecundante do sémen apenas durante um período de 4 a 6 horas.

O diluidor pode ser de gema de ovo-tris-fructose, gema de ovo-glucose-citrato ou leite de vaca (leite inteiro aquecido, leite em pó reconstruído ou leite UHT). Estes diluidores conferem protecção aos espermatozóides contra os choques térmicos durante o arrefecimento. Para evitar o crescimento microbiano deve adicionar-se 1000 UI de penicilina sódica e 1 mg de sulfato de estreptomicina, por cada mililitro de diluidor (Guerreiro, 2002).

O arrefecimento do sémen pode fazer-se no frigorífico (4-5°C) ou em qualquer recipiente isolado hermeticamente que contenha gelo. Em qualquer uma das situações o ritmo de arrefecimento deve ser regulado pelo tamanho do recipiente e pela quantidade de água que envolve os tubos de sémen. Este processo tem uma duração média de 1-1,5 horas, período durante o qual a descida da temperatura deve ocorrer de forma gradual. É fundamental que a descida de temperatura, entre os 18 e os 5°C, ocorra lenta e progressivamente, porque caso contrário, ocorrem choques térmicos aos quais os espermatozóides são altamente sensíveis. Depois de atingidos os 5°C é fundamental que se mantenha esta temperatura durante o armazenamento e transporte dos espermatozóides.

Segundo Traldi (1994), o sémen deve ser transportado numa garrafa térmica cheia de gelo, com as palhinhas envolvidas em algodão para evitar o contacto directo com o gelo. A inseminação com sémen refrigerado deve ter uma diluição de nove partes de diluidor para uma de sémen, isto é, para 13,5 ml de diluidor deve adicionar-se 1,5 ml de sémen. Esta seria a quantidade adequada para inseminar 30 fêmeas com uma dose de 0,5 ml de sémen.

A escolha do diluidor é fundamental para a preservação dos espermatozóides, não podendo ser tóxico, de baixo custo, preparação fácil e com pH e pressão osmótica compatível com a sua sobrevivência. Segundo Traldi (1994), o sémen fresco e refrigerado apresenta maior fertilidade quando a inseminação é transperitoneal. Por fim, a dose de sémen deve ser aquecida a 37°C durante 10 segundos antes da sua aplicação.

2.9.1.4.2. Sémen Congelado

A conservação do sémen congelado é efectuada a -196°C em azoto líquido. Deste modo, é possível conservar o sémen por um período de tempo mais largo, sem alterar a capacidade fecundante, uma vez que o metabolismo do espermatozóide pára a esta temperatura. Contudo, a falta do azoto líquido, mesmo que por poucas horas, pode resultar na destruição completa de um banco de sémen.

Os diluidores para congelação de sémen devem ter as mesmas características dos utilizados para sémen fresco e refrigerado, ou seja, devem proteger os espermatozóides das mudanças de pH e toxicidade. Além de conter uma fonte de energia, um agente para proteger a célula do choque térmico durante o arrefecimento e um agente crioprotector para proteger os espermatozóides dos danos causados na membrana plasmática durante a congelação. Os diluidores mais utilizados para a criopreservação de sémen têm, normalmente, como constituintes os seguintes compostos: leite desnatado, glicose, água bi-destilada, penicilina G sódica e sulfato de estreptomicina. Alguns autores, recomendam a gema de ovo por ser rica em fosfolípidos, o que protege os espermatozóides do choque térmico a temperaturas abaixo dos 0°C. No entanto, como já foi referido anteriormente os fosfolípidos em contacto com as enzimas do plasma seminal desencadeiam reacções bioquímicas que libertam compostos tóxicos para os espermatozóides. Para contrariar este facto, alguns autores sugerem a lavagem do sémen

para remover o plasma seminal. Esta lavagem deve ser feita com o sémen à temperatura ambiente e centrifugado a 600 x G durante 10 minutos numa proporção de 1:9 em citrato de sódio a 3% a 37°C (Muniz, 2003). Caso não se remova o plasma seminal por lavagem do sémen, a percentagem de gema de ovo no diluidor não deve exceder os 2%. No entanto, segundo Ferrari *et al.* (1998), um diluidor à base de tris com apenas 1,5% tem efeito tóxico sobre os espermatozóides. Como crioprotector utiliza-se normalmente o glicerol.

Cada ejaculado permite criopreservar em média 10 a 40 doses de sémen dependendo da quantidade do mesmo e dos espermatozóides por dose. Segundo Mascarenhas e Simões (2005), no sémen congelado, os índices de fertilidade obtidos são ligeiramente mais baixos que os obtidos com sémen refrigerado, devendo o número de espermatozóides por dose ser de 125 milhões.

A congelação de sémen pode ser efectuada de duas formas distintas: por congelação convencional ou automatizada

2.9.1.4.2.1. Congelação Covencional

A congelação segundo o método convencional é feita de duas formas, sendo estas a congelação horizontal ou vertical.

A congelação horizontal é feita numa caixa de esferovite que serve de câmara de congelação. Esta deve ter, no seu interior, um suporte para colocar as palhinhas na posição horizontal. O suporte deve estar colocado a 20 cm de altura do fundo da caixa e o azoto líquido a 15 cm. À altura de 5 cm do azoto líquido as palhinhas atingem temperaturas de -70 a -80°C, devendo permanecer assim por 15 minutos. De seguida devem ser submersas no azoto líquido (-196°C) por 5 minutos (Betini *et al.*, 1998).

A congelação vertical é efectuada segundo o método desenvolvido por Souza e Mies Filho em 1986. Este método baseia-se na utilização de uma caixa de madeira perfurada no centro, de forma cilíndrica com 9,5cm de diâmetro, e com um suporte para colocar as palhinhas na posição vertical. O suporte é formado por um cilindro de tela metálica de 8,5cm de diâmetro e 11,5cm de altura, uma parte superior e outra inferior, constituídas por placas perfuradas de aço inoxidável para permitirem a passagem das palhinhas. Sob a placa inferior, é colocada uma tela fina de apoio para as palhinhas e uma estrutura de arame em forma de alça na parte superior, de modo a facilitar o manuseamento. Posteriormente, coloca-se o sémen no cilindro, e por sua vez, na caixa de congelação, à altura de 5 cm da superfície do azoto líquido, durante 15 minutos, a -70 a -80°C. De seguida mergulha-se o sémen no azoto líquido (-196°C) durante 5 minutos (Betini *et al.*, 1998; Muniz, 2003).

2.9.1.4.2.2. Congelação Automatizada

A congelação pode ser feita usando uma máquina de congelação automática, onde a redução da temperatura ocorre automaticamente e de forma controlada.

A congelação automática foi descrita pela primeira vez em 1973 por Almquist e Wiggins, sendo posteriormente estudada de forma mais aprofundada em 1979 por Landa e Almquist (Gonzalez, 2004). Estes autores concluíram que a congelação de grande número de palhinhas não afecta a integridade do acrossoma e a motilidade pós-descongelação, comparativamente às congelações de sémen feita nos vapores de azoto líquido. Na congelação programada as palhinhas ficam distribuídas em diferentes níveis, o que contribui para variações na taxa de congelação individual de cada palhinha dentro de cada ciclo de congelação (Gonzalez, 2004).

2.9.1.5. Crioprotectores

O processo de congelação requer a utilização de agentes crioprotectores em quase todos os sistemas biológicos. A primeira referência de crioprotectores data de 1908, utilizada por Maxinov em células de plantas. Este utilizou uma solução contendo glicerol e observou que as células das plantas sobreviviam a uma congelação a -22°C (Bittencourt, 2006). Estes agentes devem ser adicionados aos diluidores, de modo a garantir a sobrevivência dos espermatozóides durante o processo de congelação e descongelação. Os crioprotectores podem ser divididos em dois tipos: intracelulares e extracelulares

Os crioprotectores são classificados como intracelulares ou penetrantes, quando exercem acção protectora no interior da célula. E extracelulares ou não penetrantes, quando actuam no exterior da célula.

2.9.1.5.1. Crioprotectores Intracelulares

Os crioprotectores penetrantes (CP) são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica causadas pela a congelação. Um crioprotector ideal deve possuir as seguintes características físico-químicas: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade celular. Estes crioprotectores possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogénio com as moléculas de água, diminuindo a formação de cristais de gelo e o seu tamanho bem como a concentração de solutos nos meios extra e intracelulares. Estas ligações também auxiliam na estabilização da estrutura quaternária das proteínas da membrana evitando a desidratação. A característica mais importante que todos os crioprotectores devem apresentar é a capacidade de se ligarem à molécula de água (Gonzalez, 2004).

Em 1987 Ashwood-Smith sugeriu diferentes componentes como agentes crioprotetores para congelamento de sémen. Estes foram álcoois como etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e polietilenoglicol, e também as amidas, como a acetamida, formamida, lactamida, e o dimetilsulfoxido (DMSO) (Gonzalez, 2004). O uso de crioprotetores para os quais as células têm alta permeabilidade resulta numa boa sobrevivência celular.

De entre os crioprotectores referidos anteriormente o glicerol é o CP utilizado com maior frequência na congelação de sémen caprino, tendo acção a nível intra e extracelular na protecção das estruturas celulares. A capacidade protectora do glicerol deve-se à sua propriedade coligativa ou de ligação com a água, ao aumento de volume de canais de solventes descongelados, à diluição de altas concentrações de sais e diminuição da pressão osmótica do meio (Bittencourt, 2006)

Outros crioprotectores de rápida penetração, como o etilenoglicol, propanodiol e o DMSO têm menores pesos moleculares que o glicerol, e agem protegendo o espermatozóide provavelmente, através do mesmo mecanismo que o glicerol (Bittencourt, 2006)

2.9.1.5.2. Crioprotectores Extracelulares

Os crioprotectores extracelulares aumentam a osmolaridade do meio extracelular, permitindo a passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular impedindo a formação de cristais de gelo no seu interior durante o processo de congelação. Os crioprotectores não penetrantes são compostos com alto peso molecular como açúcares, lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite, albumina sérica bovina (BSA) e em alguns casos aminoácidos. São exemplo dos açúcares a frutose, trealose, lactose, manose, rafinose, e polímeros sintéticos como a

polivinilpirrolidona, metilcelulose e amido (Gonzalez, 2004; Bittencourt, 2006). Outros dois compostos que também evidenciam características crioprotectoras são a glicina betaína e a prolina, por estabilizarem a membrana plasmática e provavelmente manterem a hidratação das suas proteínas.

A gema do ovo é um dos crioprotectores mais utilizados para proteger a membrana espermática, nomeadamente nos caprinos. As lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo, especificamente os fosfolípidos, têm sido determinadas como componentes indispensáveis à preservação e protecção do espermatozóide. Segundo Watson (1995), a gema do ovo é o composto que melhor protege o espermatozóide do choque térmico, e consequentemente previne que a cauda se dobre e não afecte a motilidade espermática.

Para além dos agentes crioprotectores, podem ser adicionadas outras substâncias ao meio de congelação, sendo estas iónicas ou não. Estas substâncias contribuem para manter a osmolaridade e o pH (tampão), podendo ainda ser adicionados antibióticos e enzimas.

III. Material e Métodos

3.1. Recolha de Sémén

A recolha de sémén foi realizada nos Serviços de Desenvolvimento Agrário da Ilha Terceira (SDAT), sendo utilizados 3 bodes (2 de raça Saanen e 1 de raça Alpina) com mais de 2 anos de idade. As recolhas (3 por cada animal) foram efectuadas durante o mês de Fevereiro de 2012, em 3 sessões espaçadas de aproximadamente 5 dias, seguindo o desenho factorial de medições repetidas. O espaçamento entre sessões de recolha teve como objectivo garantir o normal restabelecimento da produção espermática.

A colheita do sémén foi obtida com vagina artificial, após os bodes terem sido treinados durante cerca de 3 semanas, utilizando uma fêmea com cio induzido. A indução artificial foi conseguida com uma injeção intramuscular de 250 µg de benzoato de estradiol diluído em 2,5 ml de óleo mineral aplicada 48 horas antes da hora prevista para a recolha. Após esta injeção era feito o despisto do cio, que ocorria normalmente entre as 16 e 36 horas. Vinte e quatro horas após o aparecimento do cio era injectado novamente benzoato de estradiol numa dose de 100 µg (em 1 ml de óleo mineral).

As recolhas foram sempre efectuadas pela manhã com inicio por volta das 08:00 horas e em cada período de recolhas os bode alternavam aleatoriamente. A vagina artificial utilizada continha no seu interior água aquecida a 48-50 °C e era colocada uma pequena quantidade de gel à entrada da mesma, de modo a facilitar a penetração. Para evitar o choque térmico dos espermatozóides os tubos de recolha eram aquecidos a 33-37°C. O transporte do sémén para o laboratório era feito numa caixa térmica com água a 30-33°C, de modo a garantir a sua integridade.

3.2. Avaliação do Sêmen

O sêmen era rapidamente transportado até ao laboratório, e imediatamente após a sua chegada é colocado em banho-maria a 36°C, procedendo-se depois à sua avaliação. As características seminais avaliadas foram o volume, a concentração e a mobilidade massal.

3.2.1. Cor e Consistência

Estas características foram avaliadas subjectivamente por observação directa logo após a colheita de sêmen. A cor do sêmen pode variar de animal para animal e em função dos elementos anormais que possa conter. A consistência indica-nos, de um modo geral, se a concentração espermática é baixa ou alta, ou seja, um ejaculado com uma aparência mais aquosa será indicativo de uma baixa concentração de espermatozóides.

3.2.2. Volume

O volume foi avaliado por micropipetagem, imediatamente a seguir à recolha, de modo a garantir maior exactidão.

3.2.3. Mobilidade Massal

Esta avaliação foi efectuada o mais rápido possível, uma vez que o decréscimo dos movimentos é acentuado com o passar do tempo. Deste modo, colocou-se uma gota de 5 µl de sêmen puro numa lâmina previamente aquecida a 37°C, na estufa, tendo sido

observada no microscópio óptico com uma ampliação de 100x. Avaliou-se o vigor dos movimentos de onda, em vários campos, de acordo com o descrito no Quadro 2.

3.2.4. Concentração Espermática

A concentração foi determinada por contagem através da câmara de Neubauer, preparando uma solução para a mesma. A solução resultou da diluição de 10 µl de sémen puro com 990 µl de água destilada (diluição 1:100). Nos casos onde não era possível efectuar a contagem devido à concentração espermática a diluição era de 1:1000. Após a homogeneização da solução, preparou-se a câmara de Neubauer, colocando-se 5 µl de água destilada em cada um dos lados da lâmina para fixar a lamela, e posteriormente 10 µl da solução anterior, no centro e bordo da lamela, de modo a permitir a descida por capilaridade. Depois deixou-se repousar a placa para que ocorresse a sedimentação dos espermatozóides no fundo da lâmina. Por fim, colocou-se o hemocitómetro cuidadosamente no microscópio e visualizou-se numa ampliação de 400x. A contagem foi efectuada diagonalmente nos 5 quadrados maiores.

3.2.5. Percentagem de Espermatozóides Vivos no Sémen Fresco

Antes da congelação do sémen e após o processo de diluição para enchimento das palhinhas, procedeu-se à contagem dos espermatozóides vivos por citometria de fluxo. Para isso preparou-se uma solução com 20 µl de sémen e 160 µl de PBS, da qual se retirou 5 µl (50×10^6 spz/ml) e se adicionou 495 µl de solução para o citómetro. Esta última solução foi preparada com 4 ml de PBS e, dois marcadores fluorescentes, sendo estes o PI e o SYBR-14, com 10 e 4 µl respectivamente. De seguida, colocou-se a solução 15 minutos no escuro, e posteriormente no citómetro para avaliação.

3.2.6. Percentagem de Espermatozóides Vivos e Integridade do Acrossoma no Sémen após Descongelção

Para determinar a percentagem de espermatozóides vivos e com o acrossoma intacto foi utilizado novamente o citómetro. Primeiramente, descongelou-se as palhinhas (uma por cada amostra) em banho-maria a 37°C durante 30 segundos. De seguida colocaram-se na estufa a 37°C três tubos devidamente identificados para cada dose de sémen. Um destes tubos servia para colocar a amostra de sémen, outro para proceder à diluição e o último para levar ao citómetro para a avaliação.

A diluição foi feita num tubo eppendorf com 10 µl de sémen em 990 µl de PBS. Depois retirou-se 295 µl desta solução e adicionou-se 6 µl de PI (0,5 mg/ml) e 20 µl de FITC-PSA, incubando-se de seguida na estufa a 37°C durante 10 minutos. Por fim, colocou-se 600 µl de PBS e avaliou-se no citómetro.

3.3. Diluição do Sémen

As amostras de sémen foram diluídas de forma a obter-se uma concentração final de 400×10^6 spz/ml. O diluidor utilizado foi à base de tris-gema ovo e preparado apenas numa fracção. Para isso adicionou-se os seguintes compostos: 375 mM de Tris, 124 mM de ácido cítrico, 41,6 mM de glucose, 9% (V/V) de gema ovo e 5% (V/V) de glicerol devendo-se obter um pH de 6,8.

3.4. Congelação do Sémén

Após a diluição e enchimento das palhinhas, procedeu-se ao seu arrefecimento. Estas foram cuidadosamente colocadas numa caixa de isopor no frigorífico (4°C) durante 2 horas e 30 minutos. A congelação de sémén foi efectuada com um aparelho automático, designado como IceCub. As palhinhas foram colocadas no interior deste aparelho num suporte horizontal, onde se procedeu à congelação segundo 3 curvas, cada uma com três rampas de arrefecimento. As temperaturas das diferentes curvas foram iguais, variando apenas a temperatura de arrefecimento na segunda rampa (Quadro 3).

Quadro 3 - Curvas de Congelação com respectivas Rampas e Temperaturas de Arrefecimento

Curva	Rampa	°C arrefecimento
A	1	-4 a -5 °C
	2	-5 a -110 °C
	3	-110 a -140 °C
B	1	-4 a -5 °C
	2	-5 a -110 °C
	3	-110 a -140 °C
C	1	-4 a -5 °C
	2	-5 a -110 °C
	3	-110 a -140 °C

3.5. Análise Estatística

O ensaio foi delineado segundo um desenho factorial de medições repetidas (3 curvas de congelação x 3 bodes x 3 dias de colheita de sémen). Os dados foram assim tratados de acordo com este modelo recorrendo-se à ANOVA factorial de medições repetidas considerando-se a curva de congelação e o bode como “between subjects factors” e o dia de colheita como “within subjects variable”. Relativamente à comparação das médias dos parâmetros do sémen avaliados macroscopicamente recorreu-se à ANOVA simples. Sempre que a ANOVA detectava diferenças significativas dentro das variáveis estudadas, seguia-se um teste de comparações múltiplas (LSD) para identificar essas diferenças. Todos os valores percentuais foram previamente transformados segundo a fórmula $P' = \arccos \sqrt{P}$ em que P representa o valor original. Contudo, nos quadros apresentados ao longo do texto os valores referidos são sempre os originais.

IV. Resultados

4.1. Avaliação Macroscópica do Sêmen

A primeira avaliação foi efectuada visualmente, imediatamente após as recolhas de sêmen, no tubo de recolha, tendo sido avaliados a cor, a consistência e o volume. Posteriormente, procedeu-se à observação microscópica no laboratório onde se avaliou a motibilidade massal sendo classificada de acordo com Quadro 2.

Pela observação directa foi possível perceber que o sêmen do bode 0 (raça Saanen) deveria ser eliminado do ensaio dada a sua cor e consistência, mas de modo a comprovar a qualidade do mesmo procedeu-se à observação microscópica da motilidade massal. O sêmen apresentava uma cor amarelada intensa e uma consistência bastante aquosa, o que segundo o Quadro 1 foi classificado com 0 valores numa escala de 0 a 5. Quanto à motilidade também foi atribuída a mesma classificação, dada a percentagem muito reduzida de espermatozóides vivos em 50% das recolhas de sêmen (5% spz vivos). Contudo, é de salientar que a motilidade foi aumentando gradualmente com as colheitas, tendo sido atribuída uma classificação de 2 valores a uma amostra que tinha 20% spz vivos apesar de não apresentarem movimentos de onda, e outra com 3 valores, uma vez que a amostra apresentava movimentos de onda de baixa amplitude e movimento lento.

Os restantes três animais dadores foram seleccionados para proceder à congelação de sêmen, dado que as suas características seminais obtiveram uma classificação normal. Quanto à coloração das doses de sêmen recolhidas, estas variaram entre branco, branco acinzentado a amarelado. A consistência variou entre densa e cremosa (5 valores), cremosa (4 valores) e pouco cremosa (3 valores), segundo o Quadro 1.

Relativamente ao volume do sémen (Quadro 4) os bodes 1 e 2 apresentaram valores muito semelhantes tendo o bode 3 apresentado um valor médio 20% superior sem, contudo, atingir o nível de significância estatística.

4.2 . Avaliação Microscópica do Sémen

4.2.1. Avaliação da Motilidade Massal

Na motilidade observaram-se classificações de 4 e 5 valores, uma vez que os movimentos de onda obtidos variaram entre 60 e mais de 80% spz vivos. Ainda com o sémen fresco procedeu-se a uma avaliação mais detalhada por citometria de fluxo, de modo a determinar a percentagem de espermatozóides vivos e mortos em cada uma das amostras de sémen. Embora não se tenha procedido à congelação do sémen do bode 0, no ejaculado que se obteve 60% de motilidade massal, avaliou-se a viabilidade espermática, de modo a comprovar que a eliminação deste bode para dador de sémen tinha sido uma boa opção. Deste modo, pôde-se constatar que a viabilidade do mesmo era muito reduzida, sendo a percentagem de espermatozóides vivos de apenas 28,63%. Nos restantes animais observaram-se taxas de sobrevivência mais elevadas, sendo o reprodutor 3 o que obteve melhores resultados com $42,39 \pm 8,54\%$ de spz vivos (Quadro 4). Também é de salientar que este foi o animal que obteve melhor volume de ejaculado ($V=0,89 \pm 0,07$ ml; $P>0,05$; Quadro 4). Contrariamente, o bode que apresentou menor percentagem de espermatozóides vivos foi o que produziu menor volume espermático e maior concentração de spz ($5,08 \times 10^9$ spz/ml; $P>0,05$; Quadro 4).

4.2.2. Concentração do Sêmen

O bode 2 foi o que apresentou menor concentração espermática sendo ultrapassado em cerca de 50% pelo bode 3 e em 150% pelo bode 1 ($2,05 \times 10^9$, $2,98 \times 10^9$ e $5,08 \times 10^9$ spz/ml, respectivamente). O sêmen do animal 1, contudo, apresentou a menor motilidade e a menor percentagem de espermatozoides vivos como se pode observar no Quadro 4. As diferenças não atingiram, porém, o nível de significância estatística provavelmente devida ao reduzido número de réplicas (n= 3).

Quadro 4 – Médias e Erro Padrão dos parâmetros avaliados no sêmen fresco dos diferentes bodes. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

Bode	Volume (ml)	Concentração ($\times 10^9$ spz/ml)	Motilidade	% SPZ vivos	% SPZ mortos
1	$0,72 \pm 0,28$	$5,08 \pm 1,38$	$73,3 \pm 6,67$	$30,97 \pm 16,08$	$69,03 \pm 16,08$
2	$0,75 \pm 0,08$	$2,05 \pm 0,34$	$86,25 \pm 2,25$	$42,32 \pm 5,66$	$57,68 \pm 5,66$
3	$0,89 \pm 0,07$	$2,98 \pm 0,90$	$77,5 \pm 2,50$	$42,39 \pm 8,54$	$57,61 \pm 8,53$

4.4. Avaliação por Citometria de Fluxo

4.4.1. Determinação da Relação entre Espermatozóides Vivos e Mortos

Antes de se proceder à congelação determinou-se a percentagem de espermatozóides vivos, de modo a comprovar que a mesma poderia avançar. Foram congelados os ejaculados que apresentaram mais de 30% dos espermatozóides vivos. As taxas de mortalidade espermática foram superiores a 50%, tendo variado entre 69,03% ($\pm 16,08$) para o bode 1 e 57,61% ($\pm 8,53$) para o bode 3 (Quadro 4)

4.4.2. Determinação da Integridade do Acrossoma

O sémen foi avaliado após a sua descongelação de modo a verificar qual a influencia das curvas de congelação utilizadas na sobrevivência dos espermatozóides e consequentemente na sua capacidade fecundante. O Quadro 5 apresenta os valores percentuais da conjugação do estado de vida (vivos ou mortos) e da integridade do acrossoma (intacto ou danificado) dos espermatozóides após descongelação em função do tipo de curva de congelação utilizada bem como dos efeitos dos bodes e das datas de recolha do sémen.

Após a descongelação apenas se obtiveram em média 18,78% ($\pm 1,95$, n= 27) de espermatozóides vivos, dos quais 94,36% ($\pm 1,67$, n=27) tinham o acrossoma intacto e apenas 5,64% ($\pm 1,67$, n=27) apresentavam o acrossoma danificado. A análise estatística dos dados relativos às percentagens de spz vivos e com acrossoma intacto após descongelação revelou um efeito significativo do bode e do dia de colheita. Relativamente ao tipo de curva de congelação as pequenas diferenças observadas não se revelaram estatisticamente significativas (P= 0,63) sugerindo ausência de efeito deste

factor. O animal que apresentou maior percentagem de espermatozóides vivos com o acrossoma intacto (% spz VAI) foi o bode 2 com $23,10 \pm 0,86\%$ ($P < 0,03$), sendo a curva A ($19,14 \pm 0,86\%$ spz VAI) a que apresentou melhores resultados e as colheitas do primeiro dia ($25,33 \pm 0,66\%$ spz VAI) com valores significativos para este parâmetro ($P < 0,002$). Quanto à percentagem de espermatozóides vivos mas com o acrossoma danificado (% spz VAD) o bode 1 teve $0,55 \pm 0,044\%$ spz ($P = 0,016$), com valores mais altos para a curva C ($0,49 \pm 0,044\%$ spz VAD) e para o dia de colheita 3 ($0,59 \pm 0,08\%$ spz VAD; $P = 0,032$).

No total, a percentagem de espermatozóides mortos ($81,22 \pm 1,95$, $n = 27$) após a descongelação foi superior à percentagem de espermatozóides vivos ($18,78 \pm 1,95$, $n = 27$), dos quais $14,04\%$ ($\pm 1,28$, $n = 27$) apresentavam o acrossoma intacto e $85,96\%$ ($\pm 1,28$, $n = 27$) o acrossoma danificado. Relativamente à percentagem de espermatozóides mortos mas com o acrossoma intacto (% spz MAI) o bode 3 foi o que apresentou valores mais altos com $14,16 \pm 0,63\%$ ($P < 0,01$) e com um nível de significância de $P = 0,042$ para o dia de colheita 3. No que concerne à percentagem de espermatozóides mortos mas com o acrossoma danificado (% spz MAD) o bode 1 foi o que obteve maior contagem ($82,84 \pm 1,39\%$ spz MAD; $P < 0,01$), sendo a curva C a mais afectada. Também no terceiro dia de recolha de sémen a percentagem de espermatozóides mortos com o acrossoma danificado foi mais elevada ($P = 0,003$) como se pode comprovar no Quadro 5.

Quadro 5 - Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma intacto (% spz VAI); vivos com acrossoma danificado (% spz VAD); mortos com acrossoma intacto(% spz MAI) e mortos com acrossoma danificado (% spz MAD).

Curva	% spz VAI	% spz VAD	% spz MAI	% spz MAD
A	19,14 ± 0,86	0,44 ± 0,04	11,64 ± 0,63	68,78 ± 1,39
B	17,72 ± 0,86	0,38 ± 0,04	11,36 ± 0,63	70,54 ± 1,39
C	18,18 ± 0,86	0,49 ± 0,04	10,37 ± 0,63	70,96 ± 1,39
Bode				
1	10,91 ± 0,86 ^a	0,55 ± 0,04 ^a	5,64 ± 0,63 ^a	82,84 ± 1,39 ^a
2	23,10 ± 0,86 ^{bc}	0,31 ± 0,04 ^b	13,57 ± 0,63 ^{bc}	63,01 ± 1,39 ^{bc}
3	20,96 ± 0,86 ^c	0,45 ± 0,04	14,16 ± 0,63 ^c	64,43 ± 1,39 ^c
Dia Colheita				
1	25,33 ± 0,66 ^a	0,33 ± 0,03 ^a	11,02 ± 0,87	63,31 ± 1,13 ^a
2	18,40 ± 0,66 ^b	0,40 ± 0,03	9,12 ± 0,43 ^a	72,09 ± 0,64 ^{bc}
3	11,31 ± 0,91 ^c	0,59 ± 0,08 ^b	13,23 ± 0,82 ^b	74,87 ± 1,39 ^c

4.5. Sémén Fresco vs Sémén Descongelado

Após a obtenção dos dados para a viabilidade do sémén em fresco e descongelado, procedeu-se à comparação do mesmo tendo em consideração as percentagens de espermatozóides vivos e mortos como se pode observar no Quadro 6.

O animal que apresentou maior percentagem de espermatozóides vivos no sémén fresco foi o bode 3 ($42,39 \pm 8,54$ % spz vivos). No entanto, após descongelação o sémén que obteve melhores resultados foi o bode 2 ($23,42 \pm 2,14$ % spz vivos). Deste modo o sémén que teve maior percentagem de espermatozóides mortos, quer em fresco quer após descongelação foi o bode 1 com $69,03 \pm 16,08$ e $88,49 \pm 5,86$ % respectivamente.

Se tivermos em consideração o dia em que foi efectuada a recolha de sémén o primeiro dia foi o que se obteve maior percentagem de espermatozóides vivos antes ($54,74 \pm 6,39$ % spz vivos) e depois ($25,66 \pm 2,02$ % spz vivos) da congelação.

Quadro 6 - Percentagem de espermatozóides vivos (% spz Vivos) vs mortos (% spz Mortos) no sémen fresco e descongelado em função do bode e do dia de colheita.

	% spz Vivos		% spz Mortos	
	Sémen Fresco	Sémen Descongelado	Sémen Fresco	Sémen Descongelado
Bode				
1	30,97 ± 16,08	11,52 ± 5,87	69,03 ± 16,08	88,49 ± 5,86
2	42,32 ± 5,66	23,42 ± 2,14	57,68 ± 5,66	76,57 ± 2,14
3	42,39 ± 8,54	21,41 ± 7,52	57,61 ± 8,53	78,59 ± 7,52
Dia Colheita				
1	54,74 ± 6,39	25,66 ± 2,02	45,26 ± 6,39	74,34 ± 2,02
2	25,49 ± 6,07	18,79 ± 5,61	74,51 ± 6,06	81,21 ± 5,62
3	35,45 ± 10,40	11,90 ± 7,3	64,55 ± 10,40	88,10 ± 7,29

V. Discussão

Este trabalho teve por objectivo testar a influência de três curvas [(Curva A = 25°C/min; Curva B = 35°C/min; e Curva C = 45°C/min)] de congelação de sémen de bode na percentagem de espermatozóides vivos, mortos bem como na integridade do acrossoma após a descongelação. Para isso, um total de três bodes reprodutores foram sujeitos a recolha de sémen s três vezes tendo o sémen sido dividido, em cada uma das recolhas, em três partes iguais para congelação, perfazendo um total de 27 amostras. A recolha de sémen foi efectuada segundo o método de vagina artificial. A diluição de sémen para congelação foi efectuada de acordo com o protocolo utilizado por Atessahin *et al.* (2008) com Tris e gema de ovo. Neste estudo não se procedeu à lavagem do sémen e aplicou-se uma percentagem de gema de ovo de 9%. Este facto contraria alguma da literatura existente acerca da interacção entre as enzimas do plasma seminal e lipases da gema de ovo. Segundo Evans & Maxwell (1987), quando se utilizam meios sintéticos para diluir sémen de bode, a reacção de coagulação não ocorre se a percentagem de gema de ovo após a diluição não for superior a 2%. Estudos mais recentes demonstraram que a presença de plasma seminal e de gema de ovo são importantes na sobrevivência dos espermatozóides, tendo Chauhan e Anand (1990) observado que a congelação de sémen com um diluidor à base de tris-gema de ovo, sem remoção do plasma seminal, produz elevadas taxas de fertilidade. Azerêdo *et al.* (2001) concluíram que a remoção do plasma seminal pode ser prejudicial à congelação de sémen caprino, uma vez que a percentagem de espermatozóides com membranas plasmáticas íntegras e de motilidade espermática diminuem após a centrifugação do plasma seminal. Viana *et al.* (2006), observaram que após a centrifugação do sémen houve uma brusca redução da motilidade e do vigor espermático, com um aumento de patologias no acrossoma dos espermatozóides em diferentes diluidores, o que não se

verificou com as amostras que não foram centrifugadas. Souza *et al.* (2008) também verificaram que a percentagem de patologias no acrossoma aumentou logo após a centrifugação.

No sémen fresco procedeu-se à avaliação de parâmetros como a motilidade, de modo a seleccionar os machos dadores. O animal com melhores resultados para a motilidade e menor volume de plasma seminal foi o bode 2 o que se traduziu numa maior percentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto após a descongelação. Este facto está de acordo com os resultados obtidos por Betini *et al.* (1998), o qual descreve que, possivelmente, os espermatozóides se sedimentam na extremidade inferior das palhinhas durante o processo de congelação na vertical. Este processo promove a separação do sémen do meio diluidor, reduzindo os efeitos tóxicos das fosfolipases sobre as células espermáticas, além de uma menor alteração osmótica, causando menores lesões sobre a membrana espermática (Correa *et al.*, 1996). A redução do volume seminal indica-nos uma menor secreção das glândulas acessórias, que se traduz na ausência ou diminuição de alguns constituintes, como proteínas do plasma seminal (Santos e Simplício, 2000). Souza *et al.*, 2008, descreveram que estas revestem o espermatozóide sendo consideradas como factores de capacitação espermática ou inibidores da capacitação, actuando na superfície do espermatozóide, protegendo ou estabilizando a membrana plasmática, evitando, assim, a reacção acrossómica precoce.

As diferentes curvas de congelação utilizadas (A, B e C) não apresentaram diferenças significativas na integridade acrossómica, nos quatro parâmetros estudados (VAI, VAD, MAI e MAD). Bag *et al.* (2001) efectuaram um estudo semelhante com carneiros como dadores de sémen, tendo utilizando uma taxa de congelação de 25°C/min mas com temperaturas iniciais diferentes. Pelo teste de termoresistência a

temperatura inicial de congelação de -125°C conferiu maior capacidade de criopreservação aos espermatozóides do que as temperaturas iniciais a -25°C ou -75°C ($P < 0,05$). Contudo, Maia (2010) afirma que as palhinhas expostas a temperaturas entre -75 e -125°C não afeta a sobrevivência do espermatozóide ovino, apesar do de caprino ser menos tolerante. Nos caprinos, geralmente é recomendada a exposição das palhinhas a uma temperatura de -75°C . Barbas *et al.* (2006), também utilizaram duas curvas de congelação com diferentes temperaturas na segunda rampa em sémen de carneiro colhido ao longo do ano, obtendo um valor significativamente superior ($P < 0,001$) na curva A com maior número de espermatozóides normais nas épocas de Verão e Outono. Com o processo de arrefecimento a função das proteínas é afectada, como por exemplo os canais de cálcio, o que aumenta a permeabilidade da membrana e conseqüentemente cria desordem nas reacções acrossómicas. Embora causem infertilidade, os danos acrossómicos não interferem na motilidade, e são distribuídos igualmente entre a população de espermatozóides móveis e imóveis (Santos, 2001). No entanto, segundo Bittencourt (2006) taxas de arrefecimento rápidas de 30°C até temperaturas inferiores a 10°C promovem uma queda progressiva da motilidade espermática e de acrossomas intactos antes da congelação e uma redução na percentagem de células com motilidade pós-descongelação. No presente trabalho a temperatura de arrefecimento foi igual nas três curvas, alterando-se apenas a temperatura de congelação a partir dos -5°C . Contudo, como já foi referido, os resultados das diferentes curvas não se diferenciaram significativamente, apesar de segundo (Snoeck, 2003) ser ideal uma curva de congelação lenta, de modo a permitir que os espermatozóides se desidratem e, rápida o suficiente para evitar que os espermatozóides fiquem expostos, por muito tempo, a altas concentrações de soluto.

No que concerne à avaliação dos espermatozoides vivos com o acrossoma intacto verificaram-se diferenças significativas entre os bodes ($P < 0,001$). O teste de comparações múltiplas e permitiu verificar que as diferenças apenas não foram significativas entre os bodes 2 e 3.. O mesmo se pôde observar nos dias de recolha de sémen com um nível de significância de $P < 0,002$. Também se obtiveram resultados significativos ($P = 0,016$) entre os bodes 1 ($0,55 \pm 0,04\%$ spz VAD) e 2 ($0,31 \pm 0,04\%$ spz VAD). Os resultados obtidos no bode 2 vão de encontro ao estudo de Daskin e Tekin (1996) que verificaram uma maior taxa de motilidade e uma menor percentagem de danos no acrossoma pós-descongelção para o sémen congelado sem centrifugação, em meio com gema de ovo, que para as amostras congeladas em meio sem gema de ovo (19% e 33% para motilidade e danos no acrossoma, respectivamente). No bode 2 obteve-se uma motilidade de $86,25\% \pm 2,25$ e nos espermatozoides vivos e mortos com o acrossoma danificado um total de $0,31\% \pm 0,04$ e $63,01\% \pm 1,39$ respectivamente, como se pode observar no Quadro 5. No primeiro e terceiro dia de recolhas de sémen obteve-se valores de $0,33 \pm 0,03\%$ e $0,59 \pm 0,08\%$ ($P < 0,032$), respectivamente nos spz vivos com o acrossoma danificado. Gonzalez (2004) fez um ensaio com sémen de bovino utilizando diferentes técnicas de congelação e consequentemente diferentes taxas de congelação não obtendo nos seus resultados diferenças significativas nos parâmetros estudados, entre os quais a integridade do acrossoma. Neste trabalho a percentagem de espermatozoides vivos com o acrossoma intacto (Quadro 5), foram inferiores às obtidas por Tasseron *et al.* (1977) que utilizando sémen de carneiro, observaram taxas da ordem dos 40% (detecção feita por meio de microscopia de luz), e de 70% (detectados por meio de microscopia electrónica). As diferenças deverão dever-se o efeito conjugado do bode e dia de colheita. Também Santos (2001) logo após a descongelção de sémen encontrou taxas elevadas (43% a 46%) de danos no acrossoma.

O factor bode teve influência na percentagem de espermatozóides mortos ($P < 0,001$). Em relação ao factor dia de colheita observou-se que apenas houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os dias 2 ($9,12\% \pm 0,43$) e 3 ($13,23\% \pm 0,82$) na percentagem de spz mortos. Segundo Oettlé (1986), a maioria das lesões espermáticas no acrossoma ocorrem durante o processo de diluição, arrefecimento ou como resultado do período de equilíbrio a que é submetido o sémen. Deste modo é importante que se optimize o processamento inicial do sémen, fazendo com que a grande maioria de espermatozóides chegue ao processo de congelação-descongelação sem alterações no acrossoma e, assim, com maiores possibilidades de sobreviverem ilesos ao processo de congelação. Neste contexto, Rovay (2006), realizou um ensaio para verificar o efeito de diferentes protocolos de arrefecimento sobre criopreservação do sémen caprino e avaliação das características morfológicas do sémen, não tendo encontrado diferenças significativas após o processo de criopreservação.

VI. Conclusões e Perspectivas Futuras

Este estudo teve como principal objectivo avaliar o efeito de 3 diferentes curvas de congelação na taxa de mortalidade, com ou sem danificação do acrossoma, dos espermatozóides de sémen caprino. Os resultados foram muito semelhantes para as 3 curvas tendo as diferenças, da ordem dos 2 a 3%, não se revelado estatisticamente significativas. Embora o número de réplicas (9) parecesse razoável no início do ensaio, veio a verificar-se uma variabilidade relativamente elevada (coeficiente de variação da ordem dos 14%) motivada fundamentalmente pelo efeito significativo do bode e do dia de colheita. Por outro lado, a detecção de uma acentuada influência quer do animal quer do dia de colheita do sémen, poderá ser um alerta para a necessidade de ser redobrada a atenção a dar a estes dois factores. Conjuntamente, os resultados do presente trabalho parecem sugerir a ausência de qualquer efeito das curvas de congelação testadas sobre a taxa de mortalidade pós-descongelação do sémen de caprino.

Considerando que a distinção das curvas de congelação testadas apenas incidiu na segunda rampa de arrefecimento, e de uma forma pouco acentuada (diferença de 10° C da temperatura), sugere-se testar futuramente curvas com diferenças de arrefecimento mais amplas e/ou aplicadas a diferentes rampas.

VII. Bibliografia

Amann, R.P. 1987. Function of the epididymis in bulls and rams. *J. Reprod. Fertil.*:
Suppl. 34: 115.

Arruda,R.P., Celeghini, E.C.C., Alonso, M.A., Carvalho, H.F., Oliveira, L.Z.,
Nascimento, J., Silva, D.F., Affonso, F.J., Lemes, K.M, Jaimes, J.D. 2011. Métodos de
avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros.
Revista Brasileira de Reprodução Animal, 35(2): 145-151.

Ashdow, R.R. e Hafez, E.S.E. 1993. *Anatomy of male reproduction - Reproduction in
farm animals*, ed. E.S.E. Hafez, 6th Edn. Philadelphia, PA: Lea & Febiger. 3-19.

Atessahin, A., Bucak, M.N., Tuncer, P.B. e Kizil, M. 2008. Effects of anti-oxidant
additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the
freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, 77: 38-44.

Azerêdo, G.A., Esper, C.R., Resende, K.T. 2001. Evaluation of plasma membrane
integrity of frozentawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small
Ruminant Research*, 41: 257- 263.

Bag, S., Joshi, A., Naqvi, S.M.K., Rawat, P.S., Mittal, J.P. 2002. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 72: 175-183.

Barbas, J.P., Baptista, C.C., Horta, A.E.M. 2006. Comparação entre dois métodos de congelação de sémen de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela ao longo do ano. Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100: 61-70.

Baril, G., Chemineau, P., Cognie, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P., Vallet, J.C. 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Étude FAO production et santé animales. France.

Batista, A.M. e Guerra, M.M.P. 2010. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sémen caprino. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. *Revista Brasileira de Reprodução Animal Belo Horizonte*, 34(3): 125-132.

Betini, C., Moraes, G.V., Rigolon, L.P. 1998. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sémen caprino. *Acta Scientiarum*, 20(3): 361-365.

Bittencourt, R.F. 2006. Criopreservação de sémen caprino: influência dos diluidores de congelação, tempos de equilíbrio e curvas de resfriamento. Dissertação da Tese de Mestrado de Medicina Veterinária Tropical. Universidade Federal da Bahia.

Chauhan, M.S. e Anand, S.R. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, 34(5): 1003-1013.

Chemineau, P., Cagnie, Y., Guerin, Y., Orgeur, P., Vallet, J.C. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 222.

Correa, J.R., Rodriguez, M.C., Patterson, D.J., Zavos, P.M. 1996. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 46: 413-420.

Corteel, J.M. e Leboeuf, B. 1990. Evolution technico-économique de l'insémination artificielle caprine. *Elevage & Insémination*, 237: 3-17.

Dantas, V. M. 2009. Efeito da Sazonalidade nas Características Reprodutivas de Bodes e Carneiros. Seminário de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campo Grande.

Daskin, A. e Tekin, N. 1996. The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora buck semen. *Turk Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi*, 20(5): 395-398.

Delgadillo, J.A., Chemineau, P. 1992. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94: 45-55.

Evans, G. e Maxwell, W.M.C. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. 1st Edition. Butterworths Pty Limited. Austrália.

Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210: 1131-1133.

Ferrari, S., Leinz, F., Barnabé, V.H. 1998. Inseminação artificial em cabras com sémen congelado – nota prévia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 35(5): 223-4.

Filho, W.C.M. 2006. Espermatogénese em bovinos. *Seminário: Reprodução Animal*. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Garner, D. L. e Hafez, E.S.E. 1993. Spermatozoa and seminal plasma - *Reproduction in Farm Animals*. 6th Edition. Philadelphia PA: Lea & Febiger. 165-187.

Gibbons, A. 2002. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras de raza angora. *Taurus*. 4(16): 24-32.

Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. 2001. Biotécnica aplicada à reprodução animal. São Paulo. 2, 4 e 7: 15-23, 57-65, 111-23.

González, F.H.D. 2002. Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária. Porto Alegre.

Gonzalez, R.A.F. 2004. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotectores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino. Dissertação de Tese de Pós-Graduação em Reprodução Animal. Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo.

Granados, L.B.C., Dias A.J.B., Sales, M.P. 2006. Aspectos Gerais da Reprodução de Caprinos e Ovinos. Projeto PROEX/UENF, Campo dos Goytacazes, 54.

Guerreiro, R.I.N. 2002. Caracterização reprodutiva e avaliação da conservação de sémen por um período de 48 horas em diferentes tipos de diluidores em bodes da raça Algarvia. Relatório de estágio: Licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade dos Açores. Angra do Heroísmo.

Harrison, R.A.P. e Vickers, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88: 343-352.

Karsch, F.J. 1984. Endocrine and environmental control of oestrous cyclicity in sheep. *Reproduction in sheep*. Lindsay & Pearce, Australian Academy of Science, 10-5.

Kelliher, K. 2007. The Combined Role of the Main Olfactory Bulb and Vomeronasal Systems in Social Communication in Mammals. *Hormones Behavior*, 52: 561-570.

Leite-Browning, M.L. 2009. Extension Animal Scientist. Alabama A&M University. Artigo disponível em: www.aces.edu/urban Pesquisado em: 30 de Abril de 2012.

Maia, M.S. 2010. Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos. Governo do Estado do Rio Grande do Norte, 13.

Mascarenhas, R. e Simões, J. 2005. Inseminação artificial em caprinos de raças autóctones. *Ancabra*, 7: 11-14.

Matos, D.I., Araújo, A.A., Roberto, L.G., Toniolli, R. 2008. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32: 225-232.

Meijer, J.C. e Vlissigen, J. M. F. 1993. Gross structure and development of reproductive organs - Reproduction in Domesticated Animals. Elsevier. 9-54.

Muniz, A. P. 2003. Inseminação Artificial em Caprinos. Monografia para obtenção do título de Bacharel em Veterinária. Universidade Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária. São Paulo.

O'Brien, P.H. 1982. Flrhmen: Its occurrence and possible functions in feral goats. *Animal Behaviour*, 30: 1015-1019.

O'Donnel, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 22(3): 289-318.

Oettlé, E.E. 1986. Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science*, 12: 145-150.

Oliveira, M.E.F. 2009. Ovinos: Comportamento Sexual de Machos e Fêmeas. *Revista InteRural*, 24(3): 62.

Patiño, S.R.G. 2002. Comportament Sexual Masculí. In: Índice Etologia (Catalá)

Documento disponível em : <http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Etologia/indice.htm>.

Pesquisado em: 5 de Maio de 2012.

Ponsart, C., Gerard, O., Caplin, S. 2004. Insemination: history and state of the art in animals. *Gynecol Obstet Fertil*. 32: 880-886.

Quittet, E. 1980. La chèvre – Guide de l'éleveur. Editora: La Maison Rustique. Paris.

Ribeiro, S.D.A. 1997. Caprinicultura - Criação Racional de Caprinos. Editora Nobel.

Sao Paulo. Livro disponível em:

<http://books.google.pt/books?id=gssTh9pKbMEC&printsec=frontcover&dq=inauthor:>

[%22Silvio+Doria+de+Almeida+Ribeiro%22&hl=pt-PT&sa=X&ei=FVBKUc-](http://books.google.pt/books?id=gssTh9pKbMEC&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Silvio+Doria+de+Almeida+Ribeiro%22&hl=pt-PT&sa=X&ei=FVBKUc-)

[4CKWP7Aan3ICgDw&ved=0CDAQuwUwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.pt/books?id=gssTh9pKbMEC&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Silvio+Doria+de+Almeida+Ribeiro%22&hl=pt-PT&sa=X&ei=FVBKUc-4CKWP7Aan3ICgDw&ved=0CDAQuwUwAA#v=onepage&q&f=false) Pesquisado

em: 19 de Junho de 2012.

Rovay, H. 2006. Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotectores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos. Dissertação de pós-graduação de Mestre. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

Sá, F.V. 1990. A cabra – da produção de leite à protecção da natureza. 2ª Edição.

Editora: Clássica Editora. Lisboa, Portugal.

Santos, A.D.F. 2001. Características reprodutivas e congelamento do sémen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo. Tese de Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa.

Santos, D.O., Simplício, A.A. 2000. Parâmetros escrototesticulares e de sémen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35(9): 1835-1841.

Setchell, B.P. 1993. Male reproduction - Reproduction in Domesticated animals. G. J. King: Elsevier, 83-127.

Silva, E.C.B. e Guerra, M.M.P. 2012. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. Revista de Ciências Agroveterinárias. 11(2): 162-169.

Silva, S.V., Batista, A.M., Coletto, Z.F., Guerra, M.M.P. 2009. Diferentes Métodos e Técnicas na Avaliação Espermática: Uma Breve Revisão. Ciência veterinária tropical, 12(1,2,3): 1-15.

Snoeck, P.P.N. 2003. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Sousa, J.P.F. 2000. Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. Relatório de estágio: Licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade dos Açores. Vale de Santarém.

Souza, A.F., Leitão, M.C.G., Batista, A.M., Porto, A.L.F., Filho, J.L.L., Guerra, M.M.P. 2008. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. Ciência Rural.

Stellflug, J.N. e Lewis, G.S. 2007. Effect of early and late exposure to estrual ewes on ram sexual performance classifications. *Animal Reproduction Science* 97: 295-302.

Tasseron, F., Amir, D., Schindler, H. 1977. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal Reproduction Fertility*, 51: 461-462.

Traldi, A.S. 1994. Tópicos em reprodução e I. A. em caprinos – Manual técnico.

Viana, A.K.S., Chalhoub, M., Filho, A.L.R., Almeida, A.K., Portela, A.P.M., Bittencourt, R.F., Alves, S.G.G., Bittencourt, T.C.C., Quintela, A.T. 2006. Avaliação in vitro do sémen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado – glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*. Goiânia, 7(1): 67-76.

Vidigal, K.F. 2008. Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal. Dissertação da Tese de Mestrado de Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí. Teresina.

Vitaliano, A. B. 2011. Avaliação do Comportamento Reprodutivo Caprino e Ovino com o uso do efeito Macho Interespécie. Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility Development*, 7(4): 871-91.

VIII. ANEXOS

Quadro 8.1. Análise de variância relativa aos parâmetros do sémen fresco (volume, concentração e motilidade)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Volume	Between Groups	,062	2	,031	,397	,685
	Within Groups	,627	8	,078		
	Total	,689	10			
Concentração	Between Groups	16,131	2	8,066	4,241	,056
	Within Groups	15,214	8	1,902		
	Total	31,345	10			
Motilidade	Between Groups	312,311	2	156,155	3,104	,100
	Within Groups	402,417	8	50,302		
	Total	714,727	10			

Quadro 8.2. Média e Erro Padrão dos espermatozoides vivos com acrossoma intacto e danificado

Spz vivos e Acrossoma Intacto Spz vivos e Acrossoma Danificado * Bode			
Bode		Spz vivos e Acrossoma Intacto	Spz vivos e Acrossoma Danificado
1	Mean	95,0758	4,9241
	N	9	9
	Std. Deviation	7,80262	7,80265
	Std. Error of Mean	2,60087	2,60088
2	Mean	97,2211	2,7788
	N	10	10
	Std. Deviation	2,38595	2,38580
	Std. Error of Mean	,75450	,75446
3	Mean	89,9946	10,0055
	N	8	8
	Std. Deviation	12,99390	12,99375
	Std. Error of Mean	4,59404	4,59398
Total	Mean	94,3648	5,6351
	N	27	27
	Std. Deviation	8,68042	8,68039
	Std. Error of Mean	1,67055	1,67054

Quadro 8.3. Média e Erro Padrão dos espermatozoides vivos com acrossoma intacto e danificado

Spz mortos e Acrossoma Intacto Spz mortos e Acrossoma Danificado * Bode			
Bode		Spz mortos e Acrossoma Intacto	Spz mortos e Acrossoma Danificado
1	Mean	15,0358	84,9642
	N	9	9
	Std. Deviation	7,10195	7,10195
	Std. Error of Mean	2,36732	2,36732
2	Mean	13,8576	86,1424
	N	10	10
	Std. Deviation	5,06297	5,06297
	Std. Error of Mean	1,60105	1,60105
3	Mean	13,1485	86,8515
	N	8	8
	Std. Deviation	8,43113	8,43113
	Std. Error of Mean	2,98086	2,98086
Total	Mean	14,0402	85,9598
	N	27	27
	Std. Deviation	6,64312	6,64312
	Std. Error of Mean	1,27847	1,27847

Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma intacto (% spz MAI)

Quadro 8.4. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma intacto (% spz MAI) das diferentes curvas de congelação

Estimates

Measure: MEASURE_1

Curva	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
A	19,140	,856	16,765	21,515
B	17,718	,856	15,343	20,093
C	18,178	,856	15,803	20,553

Quadro 8.5. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma intacto (% spz MAI) dos bodes

Estimates

Measure: MEASURE_1

Bode	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	10,971	,856	8,596	13,346
2	23,104	,856	20,729	25,480
3	20,960	,856	18,585	23,335

Quadro 8.6. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma intacto (% spz MAI) no dia da colheita

Estimates

Measure: MEASURE_1

DiaColheita	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	25,331	,658	23,504	27,158
2	18,397	,664	16,553	20,240
3	11,308	,905	8,794	13,822

Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma danificado (% spz MAI)

Quadro 8.7. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma danificado (% spz MAI) das diferentes curvas de congelação

Estimates

Measure: MEASURE_1

Curva	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
A	,442	,044	,321	,563
B	,383	,044	,263	,504
C	,490	,044	,369	,611

Quadro 8.8. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma danificado (% spz MAI) dos bodes

Estimates

Measure: MEASURE_1

Bode	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	,551	,044	,430	,672
2	,313	,044	,193	,434
3	,451	,044	,330	,572

Quadro 8.9. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz vivos com acrossoma danificado (% spz MAI) no dia da colheita

Estimates

Measure: MEASURE_1

DiaColheita	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	,332	,026	,260	,404
2	,396	,027	,319	,472
3	,588	,076	,376	,800

Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma intacto (% spz MAI)

Quadro 8.10. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma intacto (% spz MAI) das diferentes curvas de congelação

Estimates

Measure: MEASURE_1

Curva	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
A	11,641	,627	9,901	13,381
B	11,363	,627	9,624	13,103
C	10,369	,627	8,629	12,109

Quadro 8.11. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma intacto (% spz MAI) dos bodes

Estimates

Measure: MEASURE_1

Bode	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	5,642	,627	3,903	7,382
2	13,567	,627	11,827	15,306
3	14,164	,627	12,425	15,904

Quadro 8.12. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma intacto (% spz MAI) no dia da colheita

Estimates

Measure: MEASURE_1

DiaColheita	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	11,024	,866	8,620	13,429
2	9,120	,429	7,929	10,311
3	13,229	,818	10,957	15,501

Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma danificado (% spz MAD)

Quadro 8.13. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma danificado (% spz MAD) das diferentes curvas de congelção

Estimates

Measure: MEASURE_1

Curva	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
A	68,776	1,392	64,910	72,641
B	70,537	1,392	66,672	74,402
C	70,962	1,392	67,097	74,827

Quadro 8.14. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma danificado (% spz MAD) dos bodes

Estimates

Measure: MEASURE_1

Bode	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	82,837	1,392	78,972	86,702
2	63,012	1,392	59,147	66,877
3	64,426	1,392	60,560	68,291

Quadro 8.15. Média e Erro Padrão das percentagens dos spz mortos com acrossoma danificado (% spz MAD) no dia da colheita

Estimates

Measure: MEASURE_1

DiaColheita	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	63,313	1,125	60,189	66,438
2	72,087	,635	70,323	73,850
3	74,874	1,389	71,017	78,732

Análise de variância e testes de comparações múltiplas relativa à percentagem de spz vivos e com acrossoma intacto

Quadro 8.16. ANOVA de factores independentes

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	15788,089	1	15788,089	6083,499	,000
Curva	2,675	2	1,337	,515	,632
Bode	581,024	2	290,512	111,941	,000
Error	10,381	4	2,595		

Quadro 8.17. Teste de comparações múltiplas para os bodes

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) Bode	(J) Bode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-10,848*	,759	,000	-12,956	-8,739
	3	-8,353*	,759	,000	-10,462	-6,245
2	1	10,848*	,759	,000	8,739	12,956
	3	2,494*	,759	,030	,386	4,603
3	1	8,353*	,759	,000	6,245	10,462
	2	-2,494*	,759	,030	-4,603	-,386

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Quadro 8.18. Quadro 1.3. ANOVA para dia de colheita

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DiaColheita	Sphericity Assumed	710,222	2	355,111	154,466	,000
	Greenhouse-Geisser	710,222	1,536	462,288	154,466	,000
	Huynh-Feldt	710,222	2,000	355,111	154,466	,000
	Lower-bound	710,222	1,000	710,222	154,466	,000
DiaColheita * Curva	Sphericity Assumed	64,435	4	16,109	7,007	,010
	Greenhouse-Geisser	64,435	3,073	20,971	7,007	,021
	Huynh-Feldt	64,435	4,000	16,109	7,007	,010
	Lower-bound	64,435	2,000	32,218	7,007	,049
DiaColheita * Bode	Sphericity Assumed	594,242	4	148,560	64,621	,000
	Greenhouse-Geisser	594,242	3,073	193,398	64,621	,000
	Huynh-Feldt	594,242	4,000	148,560	64,621	,000
	Lower-bound	594,242	2,000	297,121	64,621	,001
Error(DiaColheita)	Sphericity Assumed	18,392	8	2,299		
	Greenhouse-Geisser	18,392	6,145	2,993		
	Huynh-Feldt	18,392	8,000	2,299		
	Lower-bound	18,392	4,000	4,598		

Quadro 8.19. Teste de comparações múltiplas para o dia de colheita

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) DiaColheita	(J) DiaColheita	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	5,326*	,759	,002	3,218	7,433
	3	12,517*	,845	,000	10,170	14,864
2	1	-5,326*	,759	,002	-7,433	-3,218
	3	7,191*	,492	,000	5,826	8,556
3	1	-12,517*	,845	,000	-14,864	-10,170
	2	-7,191*	,492	,000	-8,556	-5,826

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Análise de variância e testes de comparações múltiplas relativa à percentagem de spz vivos e com acrossoma danificado

Quadro 8.20. ANOVA de factores independentes

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	368,890	1	368,890	1321,802	,000
Curva	1,237	2	,618	2,215	,225
Bode	4,753	2	2,377	8,515	,036
Error	1,116	4	,279		

Quadro 8.21. Teste de comparações múltiplas para os bodes

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) Bode	(J) Bode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	1,006*	,249	,016	,314	1,697
	3	,319	,249	,270	-,373	1,010
2	1	-1,006*	,249	,016	-1,697	-,314
	3	-,687	,249	,051	-1,378	,005
3	1	-,319	,249	,270	-1,010	,373
	2	,687	,249	,051	-,005	1,378

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Quadro 8.22. ANOVA para dia de colheita

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DiaColheita	Sphericity Assumed	5,265	2	2,633	7,250	,016
	Greenhouse-Geisser	5,265	1,681	3,132	7,250	,023
	Huynh-Feldt	5,265	2,000	2,633	7,250	,016
	Lower-bound	5,265	1,000	5,265	7,250	,055
DiaColheita * Curva	Sphericity Assumed	2,267	4	,567	1,561	,274
	Greenhouse-Geisser	2,267	3,363	,674	1,561	,286
	Huynh-Feldt	2,267	4,000	,567	1,561	,274
	Lower-bound	2,267	2,000	1,134	1,561	,315
DiaColheita * Bode	Sphericity Assumed	2,622	4	,655	1,805	,221
	Greenhouse-Geisser	2,622	3,363	,780	1,805	,237
	Huynh-Feldt	2,622	4,000	,655	1,805	,221
	Lower-bound	2,622	2,000	1,311	1,805	,276
Error(DiaColheita)	Sphericity Assumed	2,905	8	,363		
	Greenhouse-Geisser	2,905	6,725	,432		
	Huynh-Feldt	2,905	8,000	,363		
	Lower-bound	2,905	4,000	,726		

Quadro 8.23. Teste de comparações múltiplas para o dia de colheita

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) DiaColheita	(J) DiaColheita	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,304	,216	,232	-,905	,296
	3	-1,051*	,325	,032	-1,953	-,149
2	1	,304	,216	,232	-,296	,905
	3	-,747	,300	,067	-1,578	,085
3	1	1,051*	,325	,032	,149	1,953
	2	,747	,300	,067	-,085	1,578

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Análise de variância e testes de comparações múltiplas relativa à percentagem de spz mortos e com acrossoma intacto

Quadro 8.24. ANOVA de factores independentes

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	9647,316	1	9647,316	4578,484	,000
Curva	4,528	2	2,264	1,074	,423
Bode	411,621	2	205,811	97,675	,000
Error	8,428	4	2,107		

Quadro 8.25. Teste de comparações múltiplas para os bodes

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) Bode	(J) Bode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-8,171*	,684	,000	-10,071	-6,271
	3	-8,390*	,684	,000	-10,290	-6,490
2	1	8,171*	,684	,000	6,271	10,071
	3	-,219	,684	,765	-2,119	1,681
3	1	8,390*	,684	,000	6,490	10,290
	2	,219	,684	,765	-1,681	2,119

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Quadro 8.26. ANOVA para dia de colheita

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DiaColheita	Sphericity Assumed	41,649	2	20,825	4,602	,047
	Greenhouse-Geisser	41,649	1,944	21,428	4,602	,049
	Huynh-Feldt	41,649	2,000	20,825	4,602	,047
	Lower-bound	41,649	1,000	41,649	4,602	,099
DiaColheita * Curva	Sphericity Assumed	3,594	4	,898	,199	,932
	Greenhouse-Geisser	3,594	3,887	,925	,199	,929
	Huynh-Feldt	3,594	4,000	,898	,199	,932
	Lower-bound	3,594	2,000	1,797	,199	,828
DiaColheita * Bode	Sphericity Assumed	201,106	4	50,277	11,110	,002
	Greenhouse-Geisser	201,106	3,887	51,734	11,110	,003
	Huynh-Feldt	201,106	4,000	50,277	11,110	,002
	Lower-bound	201,106	2,000	100,553	11,110	,023
Error(DiaColheita)	Sphericity Assumed	36,202	8	4,525		
	Greenhouse-Geisser	36,202	7,775	4,656		
	Huynh-Feldt	36,202	8,000	4,525		
	Lower-bound	36,202	4,000	9,051		

Quadro 8.27. Teste de comparações múltiplas para o dia de colheita

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) DiaColheita	(J) DiaColheita	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	2,063	1,071	,126	-,910	5,037
	3	-,904	,923	,383	-3,466	1,658
2	1	-2,063	1,071	,126	-5,037	,910
	3	-2,968*	1,009	,042	-5,769	-,166
3	1	,904	,923	,383	-1,658	3,466
	2	2,968*	1,009	,042	,166	5,769

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Análise de variância e testes de comparações múltiplas relativa à percentagem de spz mortos e com acrossoma danificado

Quadro 8.28. ANOVA de factores independentes

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	89428,672	1	89428,672	15237,973	,000
Curva	9,126	2	4,563	,777	,519
Bode	1109,990	2	554,995	94,567	,000
Error	23,475	4	5,869		

Quadro 8.29. Teste de comparações múltiplas para os bodes

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) Bode	(J) Bode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	14,026*	1,142	,000	10,855	17,196
	3	13,133*	1,142	,000	9,963	16,304
2	1	-14,026*	1,142	,000	-17,196	-10,855
	3	-,892	1,142	,478	-4,063	2,278
3	1	-13,133*	1,142	,000	-16,304	-9,963
	2	,892	1,142	,478	-2,278	4,063

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Quadro 8.30. ANOVA para dia de colheita

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DiaColheita	Sphericity Assumed	339,086	2	169,543	56,327	,000
	Greenhouse-Geisser	339,086	1,390	243,958	56,327	,000
	Huynh-Feldt	339,086	2,000	169,543	56,327	,000
	Lower-bound	339,086	1,000	339,086	56,327	,002
DiaColheita * Curva	Sphericity Assumed	55,046	4	13,761	4,572	,032
	Greenhouse-Geisser	55,046	2,780	19,802	4,572	,061
	Huynh-Feldt	55,046	4,000	13,761	4,572	,032
	Lower-bound	55,046	2,000	27,523	4,572	,093
DiaColheita * Bode	Sphericity Assumed	420,020	4	105,005	34,886	,000
	Greenhouse-Geisser	420,020	2,780	151,093	34,886	,001
	Huynh-Feldt	420,020	4,000	105,005	34,886	,000
	Lower-bound	420,020	2,000	210,010	34,886	,003
Error(DiaColheita)	Sphericity Assumed	24,080	8	3,010		
	Greenhouse-Geisser	24,080	5,560	4,331		
	Huynh-Feldt	24,080	8,000	3,010		
	Lower-bound	24,080	4,000	6,020		

Quadro 8.31. Teste de comparações múltiplas para o dia de colheita

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) DiaColheita	(J) DiaColheita	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5,816*	,902	,003	-8,320	-3,311
	3	-8,489*	,483	,000	-9,831	-7,147
2	1	5,816*	,902	,003	3,311	8,320
	3	-2,673	,979	,052	-5,392	,046
3	1	8,489*	,483	,000	7,147	9,831
	2	2,673	,979	,052	-,046	5,392

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

