

## FATORES ENVOLVIDOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

*(Factors involved in the cryopreservation of goat semen)*

Talita Soares CÂMARA<sup>1</sup>; Mauricio Francisco Vieira NETO<sup>1</sup>, Maria Audália Marques de CARVALHO<sup>2</sup>; José Ferreira NUNES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Campus Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-000. E-mail: [talitavet2003@gmail.com](mailto:talitavet2003@gmail.com); <sup>2</sup>Auxiliar de Pesquisas - NUGEN / UECE.

### RESUMO

Ao longo dos anos, tem-se observado um maior interesse em técnicas que possibilitem um melhor aproveitamento do material genético de reprodutores, em geral. Entretanto, para caprinos, a criopreservação seminal ainda tem alguns entraves, uma vez que não há um protocolo ideal, visando maximizar a utilização de boa qualidade e viabilidade. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo abordar os principais passos envolvidos na tecnologia da criopreservação do sêmen caprino, abrangendo desde a refrigeração, congelamento, diluentes e crioprotetores, até a influência do plasma seminal sobre esses processos; com o intuito de aumentar o conhecimento das necessidades das células espermáticas, durante todas as etapas e colaborar para desenvolvimento de protocolos mais eficientes; favorecendo, assim, o melhoramento genético de animais de alto potencial.

**Palavras-chave:** Bode, conservação seminal, espermatozoides, plasma seminal.

### ABSTRACT

Over the years, there has been a greater interest in techniques that allow a better use of the genetic material of breeding herders in general. However, for goats, seminal cryopreservation still has some obstacles, since it does not have an ideal protocol, aiming to maximize the use of good quality and viability. In this context, the present work aims to address the main steps involved in the cryopreservation technology of goat semen, ranging from refrigeration, freezing, diluents and cryoprotectants to the influence of seminal plasma on these processes; With the aim of increasing the knowledge of the needs of spermatic cells during all the stages and collaborate to develop more efficient protocols, thus favoring the genetic improvement of high genetic animals.

**Key words:** Buck, seminal conservation, sperm, seminal plasma.

\*Endereço para correspondência:  
[talitavet2003@gmail.com](mailto:talitavet2003@gmail.com)

## INTRODUÇÃO

Dentre as biotecnias aplicadas em programas de inseminação artificial, o uso do sêmen diluído criopreservado, com intuito de conservar a capacidade fecundante do sêmen por longos períodos, tem sido o foco de muitos estudos (BITTENCOURT *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2013; KUÇUK *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014; ALCAY *et al.*, 2016); entretanto, essa técnica apresenta ainda resultados insatisfatórios, uma vez que não há o domínio de protocolos ideais com os diluentes, crioprotetores e antioxidantes amplamente usados na criopreservação do sêmen caprino, visando maximizar a proteção dos espermatozoides ao choque térmico e formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROOF *et al.*, 2012). Aliado a isso, o sêmen criopreservado apresentou uma viabilidade menor, com consequente redução da fertilidade, devido aos danos celulares e moleculares causados pelo frio às células espermáticas, quando comparada ao sêmen fresco/diluído ou refrigerado (KARGAR *et al.*, 2017).

Desta forma, o desenvolvimento de métodos de congelação do sêmen de caprinos foi imprescindível, não só para facilitar o melhoramento genético dessa espécie, como, também, para fazer frente à atual demanda de sêmen e de reprodutores de raças de alta produção (AMIRIDISAND e CSEH, 2012). Portanto, essa revisão de

literatura tem como objetivo, abordar aspectos relacionados à criopreservação do sêmen caprino, para consolidação de protocolos mais eficientes.

### Diluentes Utilizados para o Sêmen

#### Caprino

Ao longo dos anos, vários diluentes foram estudados para criopreservação seminal de caprinos; dentre esses, os mais utilizados até o momento, foram aqueles à base de gema de ovo, ou leite desnatado (DORADO *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2014; SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2017; KUÇUK *et al.*, 2014); entretanto, o uso desses diluentes tem acarretado problemas de interação com enzimas do plasma seminal (EYCE/BUIII), levando à produção de substâncias tóxicas aos espermatozoides, inibindo a motilidade espermática e induzindo a reação acrossomal (NUNES e SALGUEIRO, 2011).

Numa tentativa de minimizar essas interações maléficas, vários diluentes e protocolos têm sido desenvolvidos visando diminuir danos causados à motilidade, viabilidade, morfologia, acrossoma e DNA. Nesse contexto, Bispo *et al.* (2011) sugeriram reduzir a concentração de gema de ovo para 2,5%; já Batista *et al.* (2014), levantaram a possibilidade de realizar a lavagem seminal (NUNES *et al.*, 1982).

Em decorrência disso, atualmente buscaram-se alternativas, visando substituir

esses diluentes de origem animal por diluentes alternativos, como os constituídos por água de coco (*in natura* e em pó) (NUNES e SALGUEIRO, 2011; CÂMARA *et al.*, 2016) e também por lecitina de soja (SALMANI *et al.*, 2013; VIDAL *et al.*, 2013; SALMANI *et al.*, 2014; CHELUCCI *et al.*, 2015; YODMINGKWAN *et al.*, 2016).

Os primeiros trabalhos utilizando água de coco (*in natura*) em caprinos dataram de 1985, com bons resultados sob a motilidade seminal (70%) após 120 minutos de incubação a 37 °C, quando comparado ao diluente leite desnatado (NUNES, 1986). Oliveira *et al.* (1996), ao utilizarem o mesmo diluente, obtiveram resultados de 50% de taxa de fertilidade no sêmen refrigerado a 4 °C, por até 12h, após inseminação.

Em 2002, começaram os trabalhos utilizando-se água de coco em pó (ACP), com melhoria e extensão da viabilidade a 4 °C, por até 24 horas, proporcionando uma fertilidade após IA com estro sincronizado, superior a 60% (SALGUEIRO *et al.*, 2002). Atualmente, seu uso se estendeu a ruminantes, carnívoros, humanos, equinos, peixes e animais selvagens; sendo que, em algumas dessas espécies, como cães (65,7%) e caprinos (55,6%), sua utilização vem favorecendo o nascimento de crias do sexo feminino (UCHOA *et al.*, 2012; XAVIER *et*

*al.*, 2009); entretanto, o mecanismo que atua nessa preferência ainda não foi elucidado.

A lecitina de soja é outra opção de diluente que vem sendo bastante explorado atualmente. Roof *et al.* (2012), ao compararem dois diluentes para caprinos, obtiveram valores de motilidade total e progressiva melhores para diluentes à base de soja (69,41% e 71,52%, respectivamente) do que para aqueles à base de gema (49,40% e 15,64%, respectivamente), na pós-descongelção, demonstrando que a soja pode ser utilizada com alternativa de substituição da gema de ovo e também da anulação da lavagem seminal, método que detem tempo e pode ser prejudicial à célula espermática.

Jimenez-Rabadan *et al.* (2012) observaram que o diluente à base de leite (17,7%) apresentou menores valores para motilidade, quando comparado ao diluente, acrescido de gema (45,3%) e soja (38,8%), que não diferiram entre si, para este parâmetro. Além disso, o experimento com leite demonstrou menores índices de espermatozoides intactos (10,1%) e mitocôndria ativa (8,4%).

Vidal *et al.*, (2013), ao compararem diluentes à base de leite desnatado e diferentes concentrações de soja (0,04; 0,08 e 0,16%) associada ao TRIS, observaram que a motilidade não apresentou diferença para os diluentes testados (Leite (38,33%), TRIS+0,04% soja (38,33%) TRIS+0,08%

soja (36,68%) e TRIS+0,16% soja (38,33%)), concluindo que a lecitina de soja pode substituir a gema, uma vez que foi menos viscosa, promovendo melhor proteção contra choque térmico, demonstrada pela melhora da integridade do DNA (leite - 41% e soja - 55,3%) e acrossoma (leite- 45,17% e soja (0,08%) - 43,58%); além de um maior potencial de fertilização. Além disso, observaram que altas concentrações de soja puderam ser tóxicas à célula espermática e, conseqüentemente, à integridade da membrana, por aumentar a viscosidade.

Salmani *et al.* (2013) e Chelucci *et al.* (2015) observaram que 1% de lecitina de soja para criopreservação de sêmen caprino era suficiente para manter bons índices de motilidade espermática na pós-descongelação (35,4% e 25%, respectivamente). Dessa forma, para confirmar a concentração ideal de lecitina a ser utilizada, Salmani *et al.* (2014) avaliaram níveis entre 0,5%, 1%, 1,5%, 2% e 2,5%, concluindo que, na pós-descongelação, o nível ótimo de lecitina foi de 1,5%, a fim de manter a motilidade total (58,4%), motilidade progressiva (33,8%), viabilidade (66%), percentagem de espermatozoides rápidos (50%), integridade da membrana espermática (62,7%) e viabilidade (66%), sem apresentarem diferença significativa para o TRIS; desta forma, comprovaram que

a soja pode substituir a gema de ovo, sem efeitos adversos na motilidade e viabilidade.

Entretanto, quando se fez a comparação do diluente Tris+gema (20%) com o Tris+soja (1%), o primeiro Tris obteve melhores motilidade (42%) e viabilidade (55%), embora o diluente contendo soja tenha apresentado melhor proteção ao DNA (95%) e em experimentos *in vitro*, este mesmo diluente tenha melhorado a funcionabilidade dos espermatozoides em 70%) (CHELUCCI *et al.*, 2015).

Apesar dos resultados encontrados com diluentes alternativos, até os dias atuais, o TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano) ainda é o diluente comercial mais utilizado para caprinos, por apresentar melhores resultados para o sêmen refrigerado (motilidade (40%) viabilidade seminal (27%) (YODMINGKWAN *et al.*, 2016) e descongelado (motilidade (35,4%), viabilidade seminal (67%) (SALMANI *et al.*, 2014); apesar desse diluente apresentar elevados valores de MDA-malondialdeído (4 nmol/mL), quando comparado à soja (3-3,5 nmol/mL) (SALMANI *et al.*, 2014), fato que pode ser explicado em decorrente do uso da gema no diluente base (TRIS), pois esse subproduto é resultado da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (peroxidação lipídica).

Dorado *et al.* (2010), ao avaliarem dois tipos de diluentes (Tris-glicose e leite

desnatado), com remoção de plasma seminal, na taxa de fertilidade observaram que, apesar do TRIS ter apresentado melhor desempenho *in vitro*, com motilidade de 56%, o diluente à base de leite obteve os melhores resultados para percentagem de acrossomas intactos (53,41%) e taxas de prenhez (53%); embora, ao avaliarem a fertilidade *in vivo*, observaram que não houve diferença significativa para os diluentes em questão.

Kuçuk *et al.* (2014), ao avaliarem Tris (15%) de gema e leite em pó, também observaram resultados melhores para o diluente à base de leite na pós-descongelção, no que se refere à motilidade (55,63 a 47,5%) e viabilidade (85 a 80%), quando comparado ao Tris; entretanto, os danos morfológicos causados pelo choque frio foram semelhantes na análise dos dois diluentes; concluindo, assim, que os dois protocolos utilizados naquele estudo proporcionaram parâmetros razoáveis na pós-descongelção; no entanto, o leite produziu melhor motilidade e taxas de esperma vivo, em comparação com TRIS.

### **Refrigeração do Sêmen Caprino**

O sêmen refrigerado apresentou uma taxa de fertilidade maior que a do sêmen congelado, embora tenha uma viabilidade a 4 °C de apenas 24 a 72 horas, dependendo do diluente utilizado (ROCA *et al.*, 1997). Nesse processo, alguns aspectos deveriam ser levados em consideração, com

o intuito de amenizar os danos causados às células, como, por exemplo: diluentes, curva de resfriamento e seu tempo de estabilização.

Na utilização do leite como diluente a 5 °C, obteve-se a conservação da fertilidade por até 48 horas, tendo maior fertilidade na IA do que no congelado (NUNES *et al.*, 1994).

Siqueira *et al.* (2009) demonstraram que o sêmen caprino refrigerado manteve a viabilidade por até 24 horas, com taxa de concepção de 41% a 5 °C, em Tris frutose gema. Batista *et al.* (2014), ao avaliarem o sêmen em diferentes tempos (1, 6, 12, 24 e 48h) após o resfriamento, usando Tris (12% gema) como diluente, com remoção do plasma seminal, observaram que o sêmen, a 5 °C, por até 24h, pode ser utilizado para posterior congelação, sem causar danos ou diminuir a viabilidade espermática, com motilidade em torno de 60%, mantendo 30% de espermatozoides móveis; entretanto, após esse período, a motilidade começou a decrescer (38,47%).

Alguns estudos têm demonstrado a importância da curva de resfriamento para a prevenção da ocorrência de lesões espermáticas, durante o processo de criopreservação seminal, demonstrando que curvas rápidas de resfriamento (até 5 °C) induziram a ocorrência de danos parcialmente irreversíveis, caracterizados pela redução da motilidade, seguido por um

padrão anormal de motilidade (circular ou retrógrado), danos acrossomais, lesão na membrana plasmática e redução do metabolismo, devido à perda de componentes intracelulares (VIDAL *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2014).

No que diz respeito ao tempo de estabilização a 4 °C, a maioria dos estudos presentes na literatura utilizaram 2h (JIMENEZ-RABADAN *et al.*, 2012; VIDAL *et al.*, 2013; KUÇUK *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014); entretanto, o tempo de 15 min (ABOAGLA e MOEDA, 2011) e 20 min (CHELUCCI *et al.*, 2015) também já foram utilizados, com bons resultados, sem alterações significativas à célula.

### **Congelamento do Sêmen Caprino**

Esta biotecnologia é um processo complexo, que inclui muitas fases críticas, que podem afetar os parâmetros de pós-descongelamento (incluindo danos bioquímicos, funcionais e ultraestruturais aos espermatozoides, causando capacitação espermática precoce, redução da integridade de membrana e na capacidade de fertilização), embora possibilite a utilização seminal por períodos prolongados, reduzindo custos com a aquisição e transporte de reprodutores, bem como minimizou os riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, além de favorecer a rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes

(KUÇUK *et al.*, 2014; ARAV e SARAGUSTY, 2016).

SHI *et al.* (2014), ao avaliarem o efeito da técnica rápida de congelação-descongelamento, sob os parâmetros espermáticos e alterações estruturais, utilizando TRIS, concluíram que o referido procedimento teve efeito deletério sobre a motilidade, integridade de membrana e das mitocôndrias além de aumento do percentual de anormalidades espermáticas, o que levou a uma queda acentuada na motilidade (85-35%) e aumento das anormalidades referentes a núcleo, cabeça, cauda/mitocôndria.

Yodimingkwan *et al.* (2016), ao avaliarem o efeito dos diluentes no sêmen fresco e descongelado, observaram que o sêmen fresco foi melhor, quando diluído em TRIS+gema (motilidade 40% e viabilidade 27%), quando comparado ao TRIS+ lecitina de soja (motilidade 8,11% e viabilidade 11%). Já no sêmen descongelado, não houve diferença entre os diluentes para motilidade, viabilidade e morfologia. Entretanto, a integridade acrossomal melhor considerada como diluente foi TRIS+lecitina de soja (93%); embora sua integridade de membrana tenha sido pior no TRIS+ gema (4,75%). Esse estudo concluiu que não houve diferença entre uso de 1,5% de lecitina de soja e gema para motilidade, viabilidade e morfologia, corroborando os dados de Salmani *et al.* (2014).

Arav e Saragusty (2016), ao testarem dois protocolos de congelação de espermatozoides humanos, utilizando sêmen na forma liofilizada, observaram que a congelação dupla (em tubos de ensaio de 12 mL, para elevados volumes seminiais) evitou gastos com manutenção de sêmen usando N<sub>2</sub>, reduziu uso e necessidade de espaço para armazenar palhetas, além de evitar doenças por usar ambiente estéril, apresentando motilidade após a descongelação de 65 a 80%. Com o aperfeiçoamento dessa técnica e os métodos de seleção de espermatozoides saudáveis, será possível, no futuro, estender essa técnica para caprinos.

Atualmente, vários antioxidantes vêm sendo utilizados com o intuito de diminuir os efeitos nocivos (crioperoxidativos) que as espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso, causam à motilidade e fertilidade seminal, como por exemplo: hidroxitolueno butilado (BHT), superóxido desmutase, catalase, albumina de soro bovina (BSA), trealose, glutathione, heparina e piridoxina, apresentando efeitos benéficos à célula espermática. Os efeitos nocivos são decorrentes do alto teor de ácidos graxos nos fosfolípidios da membrana e à baixa capacidade antioxidante do plasma seminal. Estas substâncias estão presentes naturalmente no plasma seminal, sendo removidas com a lavagem seminal ou diluídas na adição do diluente utilizado;

entretanto, em altas concentrações, podem reduzir o metabolismo de energia do espermatozoide, a motilidade, a viabilidade e fragmentar seu DNA (BILODEAU *et al.*, 2002).

Memon *et al.* (2011), ao avaliarem efeito de diferentes concentrações de BHT (análogo da vitamina E) adicionado ao TRIS, observaram que a adição de 0,5, 1,0 e 2,0 de BHT, melhorou a motilidade (65, 69 e 69%), integridade de membrana (69,71,72%) e acrossoma (71,73 e 73%), além da viabilidade espermática (78,78 e 78%), para sêmen resfriado e descongelado; entretanto, concentrações maiores que 3, diminuíram a qualidade seminal, sendo tóxica à célula espermática.

Salmani *et al.* (2013), ao avaliarem o efeito da glutathione em diluente à base de lecitina de soja em sêmen congelado e descongelado, observaram que a mesma não melhorou a qualidade seminal, quando se falou em motilidade, viabilidade e integridade de membrana, uma vez que degradou o DNA mitocondrial. Além disso, foi observado que a soja (+ 10mM de glutathione), reduziu a viabilidade seminal e obteve maiores valores de MDA.

Tuncer *et al.* (2013), ao utilizarem trealose (12,5; 25; 50; 75 100 e 150mM) em TRIS, observaram que a concentração de 50mM foi melhor para motilidade (61%), integridade de membrana (40%) e acrossoma (54%), por proteger a célula

contra desidratação, calor, frio e oxidação. No entanto, concentrações maiores que 100 mM acarretaram efeitos negativos para a célula espermática.

Naijian *et al.* (2013), ao avaliarem o efeito de BSA (Albumina Sérica Bovina) como antioxidante no sêmen descongelado, em diferentes concentrações (0; 2,5; 5; 10; 15 e 20mg/mL), obtiveram que as de 10 e 15mg/mL tiveram maior motilidade progressiva (33,4; 28,4%) e percentagem de células viáveis (63,8; 60,6%); entretanto, essa adição não teve efeito sobre a VCL, VSL e VAP; assim como sobre integridade acrossomal.

Shafiei *et al.* (2015), ao avaliarem o efeito do superóxido desmutase e catalase sobre sêmen, após descongelação, observaram que a catalase 400 e a associação da catalase 400+superóxido, melhoraram a motilidade total (62 e 70%), quando comparados aos outros tratamentos; além de ter reduzido os níveis de ROS (35 e 32%, respectivamente).

Olivares *et al.* (2015), ao avaliarem heparina e sódio como agente capacitantes, observaram que a motilidade foi maior na concentração de 100 uM de sódio (38,3%), do que na heparina (28%) e no grupo controle (34%) e o vigor pós-descongelação, aumentou em todos os tratamentos com sódio, quando comparado à heparina.

Daramola *et al.* (2016), ao avaliarem o efeito do leite de coco (0, 5, 10, 15 e 20 ml)

isolado ou associado à piridoxina (0, 2, 4, 6 e 8 mM), no diluente TRIS sobre a viabilidade espermática, verificaram melhores resultados para motilidade (53%), integridade de acrossoma (638,8%), membrana (73,3%) e percentagem de espermatoídes anormais (1,5 a 2,8%), do que quando observado na associação óleo de coco (15ml) e piridoxina (8mM).

Alcay *et al.* (2017), ao testarem lecitina de soja associada ao TRIS, acrescido de algumas concentrações de geléia real (0; 0,25; 0,5 e 0,75%) como antioxidante, a fim de melhorar a qualidade do sêmen pós-descongelação, concluíram que as melhores concentrações de geléia real foram 0,5 e 0,75%, mantendo a motilidade em aproximadamente 59%, a integridade do DNA em 5,6%, tendo o acrossoma e a membrana plasmática permanecido sem grandes alterações, mesmo após 6 horas de incubação.

### **Crioprotetores Envolvidos na Preservação do Sêmen Caprino**

Atualmente, os crioprotetores mais utilizados para caprinos são a gema de ovo (crioprotetor não penetrante ou externo) (ABOAGLA e TERADA, 2004) e o glicerol (crioprotetor penetrante ou interno) (LEBOEUF *et al.*, 2000), atuando nos espermatozoides protegendo do choque térmico, mantendo a motilidade, integridade da membrana mitocondrial e acrossomal.



Acredita-se que a substância da gema de ovo envolvida neste processo de proteção seja uma lipoproteína de baixa densidade (LDL), que adere à membrana celular, durante o processo de criopreservação; essa aderência restabelece a perda de fosfolípidios e, aparentemente, induz a uma mudança temporária em sua composição, impedindo, assim, a ruptura da membrana plasmática (FARSTAD, 1996).

Bispo *et al.* (2011), testaram duas concentrações de gema de ovo (2,5% e 20%) na criopreservação do sêmen, observando que a menor concentração de gema levou a menores defeitos morfológicos (2,5%) e melhor vigor (58,7%), durante a criopreservação, por promoverem menor interação dos fosfolípidios da gema de ovo com as enzimas presentes no plasma seminal, gerando, conseqüentemente, menor quantidade de ácidos graxos e menores efeitos nocivos à célula.

Tabarez *et al.* (2017), avaliaram diferentes tipos de gema de ovo, no diluente Tris e observaram que não houve diferença entre as avaliações feitas com gema em pó, *in natura* ou clarificada; entretanto, sugeriram o uso da gema de ovo em pó, por diminuir risco de contaminação e por reduzir uma necessidade de mão de obra qualificada para processamento.

No que se refere ao uso do glicerol, seu mecanismo de ação ainda não foi bem

elucidado; entretanto, é sabido que seu uso em altas concentrações pode ser tóxico à célula espermática. A concentração de glicerol dependeu da composição e pressão osmótica do diluidor e da concentração de gema de ovo (BAILEY *et al.*, 2000), sendo considerada espécie-dependente, variando de acordo com a curva de congelamento, de outros componentes do diluente e, ainda, do método de envase. Muitos trabalhos sugeriram o uso de diferentes concentrações deste crioprotetor (ABLAGLA e MOEDA, 2011; BEZERRA *et al.*, 2011; MEMON *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2014; JIMENEZ-RABADAN *et al.*, 2016); entretanto, a concentração de 7% ainda foi a mais utilizada.

Bezerra *et al.* (2011), ao avaliarem dimetilformamida (DMF), comparado ao glicerol, no diluente TRIS, observaram que o sêmen a 4 °C possuiu melhor motilidade (53 e 48,1%) e linearidade (3,5 e 1,8), quando o DMF foi usado como crioprotetor. Em contrapartida, na pós-descongelamento, a motilidade progressiva foi melhor com o glicerol; todavia, no diluente à base de leite desnatado, observaram que 7% de glicerol e 5% de DMF não apresentaram diferenças significativas para motilidade e vigor, demonstrando que, além do diluente usado, a natureza e a concentração do crioprotetor influenciaram no resultado.

### **Influência do Plasma Seminal na Qualidade do Sêmen em Caprinos**

Apesar dos vários estudos referentes à função do plasma seminal, ainda existem controvérsia sobre seus efeitos benéficos e maléficis à célula espermática (BISPO *et al.*, 2011; SALMANI *et al.*, 2014; CHECUCCI *et al.*, 2015; OLIVARES *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; TABARES *et al.*, 2017; SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2017), uma vez que nele existem proteínas que atuam no transporte, manutenção da motilidade (TOPFER-PETERSEN, 2004) e maturação final dos espermatozoides (MANN, 1978); entretanto, a interação do plasma com a enzima fosfolipase A (EYCE), presente em diluentes à base de gema de ovo, pode contribuir para a formação de lisolecitinas e ácidos graxos, os quais foram tóxicos aos espermatozoides (NUNES, 1982); além disso, a centrifugação utilizada para separar o plasma dos espermatozoides pode gerar estresse às células, reduzindo sua motilidade e elevando as patologias.

Em estudo realizado por Jimenez-Rabadan *et al.* (2012), com diluente à base de soja (Biladyl® ou Andromed®) e leite desnatado, observou-se que não houve diferença na qualidade seminal, mesmo utilizando a lavagem seminal, demonstrando que esta técnica não acarretou em melhoria para a célula espermática. Neste mesmo estudo, ao correlacionarem a lavagem

seminal com o período do ano, observaram que essa associação melhorou a motilidade e os parâmetros de VSL, LIN, na estação não-reprodutiva.

O método de coleta (vagina artificial-VA ou eletroejaculador) também interferiu na composição do plasma seminal, como demonstraram Jimenez Rabadan *et al.* (2016), que, ao utilizarem a eletroejaculação, obtiveram um maior volume do ejaculado, entretanto, apresentando uma menor concentração espermática. Isso pode ser explicado, devido a uma maior contribuição das glândulas anexas, aumentando, conseqüentemente, a liberação de EYCE, verificando que nessa técnica de coleta houve uma menor motilidade na pós-descongelação e maior percentagem de espermatozoides intactos e com fragmentação de DNA, uma vez que a eletroejaculação interferiu na quantidade de fluidos produzidos e na sua composição bioquímica, podendo interferir na congelabilidade. Já, na descongelação, foram observados maiores valores de motilidade e maior percentagem de espermatozoides intactos e mitocôndrias ativas, no método de VA, tido como mais próximo do natural.

Liu *et al.* (2016), ao avaliarem o efeito do pH sobre a viabilidade e potencial de fertilização do sêmen refrigerado (24 e 48h), com sêmen lavado, observaram que, ao longo do tempo, o declínio do pH estava

diretamente correlacionado com a queda da motilidade, independentemente do diluente usado.

Tabarez *et al.* (2017), avaliaram diferentes tipos de gema no diluente para o sêmen lavado e não lavado, observando que os parâmetros de VCL (83%), VAP (46%), VSL (34%), motilidade total (36%) e motilidade progressiva (14%), foram maiores para o diluente TRIS constituído de 15% de gema, com lavagem seminal, do que para o diluente não lavado.

Já, Santiago-Moreira *et al.* (2017), ao testarem dois métodos de lavagem seminal para criopreservação, a fim de diminuir os danos e a formação de espécies reativas de oxigênio em excesso, observaram que nenhum desses métodos causou danos ao acrossoma, podendo ser utilizados. Entretanto o método DGC (Centrifugação por Gradiente de Densidade) teve uma maior qualidade, uma vez que excluiu células mortas, anormais, detritos ou células indesejáveis, evitando toxicidade à célula e formação elevada de ROS. Além disso, o DGC apresentou motilidade de 55%, mantendo-se constante até 48h após refrigeração seminal; diferentemente do método clássico, onde, embora tenha sido observada uma motilidade de 65%, apresentou queda, após 3h de conservação sob refrigeração.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a criopreservação seminal em caprinos associada à IA possibilite o desenvolvimento de atividades agropecuárias, ainda possui alguns aspectos considerados críticos à viabilidade da célula espermática, em decorrência dos danos celulares gerados pelo processamento seminal, que comprometem a fertilidade. Sendo assim, mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento das interações ente o sêmen, os diluidores, crioprotetores e a congelabilidade individual, a fim de alcançar, com sucesso, o máximo aproveitamento genético de animais de alto valor.

## REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Effect of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1160–72, 2004.
- ABOAGLA, E.M.E; MAEDA, T. Arbutin's suppression of cryodamage in goat sperm and its mechanism of cryoprotection. *Theriogenology*, v.76, p.538–546, 2011.
- ALCAY, S.; GOKCE, E.; TOKER, M.B.; ONDER, N.T.; USTUNER, B.; UZABACI, E.; GUL, Z.; CAVUS, S. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality

- and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, v.72, n.3, p.269-273, 2016.
- ALCAY, S.; TOKER, M.B.; ONDER, N.T.; GOKCE, E. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, v.74, p.81-85, 2017.
- AMIRIDIS, G.S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v.130, n.3-4, p.152-161, 2012.
- ARAVA, A.; SARAGUSTY, J. Directional freezing of sperm and associated derived technologies. *Animal Reproduction Science*, v.169, p.6-13, 2016.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen criopreservação in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, v.21, n.1, p.1-7, 2000.
- BATISTA, M.; SANTANA, M.; ALAMO, D.; CABRERA, F.; GRACIA, G.A. Post-thaw quality of buck semen samples cooled at 5 °C up to 2 days before cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.121, p.101-105, 2014.
- BEZERRA, F.S.B.; CASTELO, T.S.; ALVES, H.M.; OLIVEIRA, I.R.S.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; BEZERRA, A.C.S.D.; SILVA, A.R. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, v.63, p.263-266, 2011.
- BILODEAU, J.F.; BRANCHETTE, S.; CORMIER, M.; SIRAD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v.57, p.1105-1122, 2002.
- BISPO, C.A.S.; PUGLIESI, G.; GALVÃO, P.; RODRIGUES, M.T.; KERB, P.G.; FILGUEIRAS, B.; CARVALHO, G.R. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.100, p.54-58, 2011.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.C.L.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.; LEAL, L.S.; OBA, E. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do semen caprino congelado-descongelado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.45, p.305-312, 2008.
- CÂMARA, T.S.; CATUNDA, A.G.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C. de M.; VIEIRA-NETO, M.F.; SALLES, M.G.F. Avaliação da capacidade reprodutiva de caprinos tratados com testosterona bioidêntica por via transdérmica. *Revista Ciência Animal*, v.26, n.3, p.03-15, 2016.

- CHELUCCI, S.; PASCIU, V.; SUCCU, S., ADDIS, D.; LEONI, G.G.; MANCA, M.E.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F.S. lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.83, p.1064–1074, 2015.
- DARAMOLA, J.O.; ADEKUNLEA, E.O.; IYASEREA, O.S.; OKEA, O.E.; SOROGBEA, T.A.; IYANDA, O.A.; KEHINDEB, A.R.; ALUKOA, S.P.; OLAOYEA, I.O.; GBADEBO, O.E.; FALOLUA, L.I.; OLUKAYODEA, E.O.; AJAYIA, R.A.; ENIKANNAYEA, O.J.; OSUNJAIYEA, E.D. Effects of coconut milk alone or supplementation with pyridoxine intris-extenders on viability of buck spermatozoa during vitrification. *Small Ruminant Research*, v.136, p.208–213, 2016.
- DORADO, J.; RODRUGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, v.68, p.168–177, 2010.
- FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.251–260, 1996.
- JIMENEZ-RABADAN, P.; RAMON, M.; GARCIA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; OLMO, E. del.; PÉREZ-GUZMAN, M.D.; BISBAL, A.; FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; GARDE, J.J.; SOLER, A.J. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science*, v.132, p. 88–95, 2012.
- JIMENEZ-RABADANA, P.; SOLER, A.J.; RAMONA, M.; GARCIA-ÁLVAREZ, O.; MORALES-MAROTO; INIESTA, M.; FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; MONTORO, V.; PEREZ-GUZMANA, M.D.; GARDEB, J.J. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v.167, p.103–108, 2016.
- KARGAR, R.; FOROUZANFAR, M.; GHALAMKARI, G.; HOSSEIN, M.; ESFAHANI, N. Dietary flax seed oil and/or Vitamin E improve sperm parameters of cloned goats following freezing-thawing. *Cryobiology*, v.74, p.110-114, 2017.
- KUCUK, N.; AKSOY, M.; UCAN, U.; AHMAD, E.; NASEER, Z.; CEYLAN, A.; SERIN, I. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology*, v.68, p.327–331, 2014.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S.; Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.

- LIU, C.; DONG, H.; MA, D.; LI, Y.; HAN, D.; LUO, M. CHANG, Z.; TAN, J. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Animal Reproduction Science*, v.164, p.47-56, 2016.
- MANN, T. Experimental approach to the study of semen and male reproductive function. *International Journal of Fertility*, v.23, n.2, p.133-137, 1978.
- MEMON, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y.M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F.M.; AUDREY, G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal Reproduction Science*, v.129, p.44-49, 2011.
- MUÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.18-31, 2008.
- NAIJIAN, H.R.; KOHRAMA, H.; SHAHNEHA, A. Z.; SHARAFIA, M. Effects of various concentrations of BSA on microscopic and freeze-thaw process. *Small Ruminant Research*, v.113, p.371-375, 2013.
- NUNES, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. Niterói, RJ. 1986. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1986, *Anais...*
- NUNES, J.F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie "in vitro" des spermatozoïdes de boue. 1982. 33p. Paris, (Tese: Doutorado em Veterinária), Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- NUNES, J.F.; CORTEEL, J.M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction Nutrition and Development*, v.22, p.611-620, 1982.
- NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; PRISCILA, L. Utilização d'uma substância ativa "JYP" presentes dans l'eau de coco pour la conservation "in vitro" et la fertilité des spermatozoïdes de mammifères. S.I.: Sn, 1994.
- NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Ruminant Research*, v.98, p.176-184, 2011.
- OLIVEIRA, C.C.S.; FONSECA, J.F. da; CAMARGO, L.S. de A.; GONC, J.M.; FABJANA, A. de S.; RODRIGUES, A.L.R.; BRANDÃO, F.Z. Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Ruminant Research*, v.127, p.44-49, 2015.
- OLIVEIRA, L.F.; AZEVEDO JÚNIOR, A.R.; TEIXEIRA, M.D.A.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Desempenho reprodutivo de cabras exóticas e SRD sincronizadas e inseminadas com sêmen refrigerado e

- diluido em água de coco. Fortaleza, CE, 1996. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1996, Anais...
- ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5 °C. *Small Ruminant Research*, v.25, p.147-153, 1997.
- ROOF, D.J.; BOWLEYA, S.; PRICE, L.L.; MATSAS, D.J. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, v.77, p.412-420, 2012.
- SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes a base de água de coco "*in natura*" e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p.96-98, 2002.
- SALMANI, H.; NABI, M.M.; VASEGHIDODARAN, H.; RAHMAN, M.B.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEB, A.; SHAKERI, M.; TOWHIDI, A.; ZARE SHAHNEH, A.; ZHAND, M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*, v.112, p.123-127, 2013.
- SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; BAHREINI, M.; SHRAFI, M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, v.68, p.276-280, 2014.
- SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M.C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DIAZ, A.; DELGADILLO, J.A.; LÓPEZ-SEBASTIAN, A. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Animal Reproduction Science*, v.181, p.141-150, 2017.
- SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESOA, M.C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DIAZ, A.; DELGADILLO, J.A.; KERTCHUNHAKIATA, K. Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v.11, p.125-130, 2016.
- SHAFIEL, M.; FOROUZANFAR, M.; HOSSEINI, S.M.; ESFAHANI, M.H.N. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat semen. *Theriogenology*, v.83, p.1321-1327, 2015.
- SHI, L.; REN, Y.; ZHOUA, H.; HOUA, G.; XUNA, W.; YUEB, W. ZHANG, C.; YANG, R. Effect of rapid freezing-thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of Chinese Taihang black goat spermatozoa. *Micron*, v.57, p.6-12, 2014.
- SIQUEIRA, A.P.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; PALHARES, M.S.; BORGES, A.M;

- BRUSCHI, M.C.M.; PEIXOTO, M.P.; ROSSI, R. Conception rate of goats inseminated with semen cooled in egg yolk diluente at 5 °C, for 12 or 24 h. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, p.66–71, 2009.
- TABAREZ, A.; GARCIA, W.; PALOMO, M. J. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donorage on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.149, p.91–98, 2017.
- TOPFR-PETERSEN, E. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science*, v.89, n.1–4, p.159–170, 2004.
- TUNCER, P.B.; TASDEMIR, U.; BUYUKLEBLEBICI, S.; OZGURTAS, T.; COSKUN, E.; EROL, H.; AYDIN, F.N.; GURCAN, I.S. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen–thawed Angora buck semen. *Small Ruminant Research*, v.113, p.383–389, 2013.
- UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA FILHO, A.C.; JUCÁ, R.P.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology*, v.77, p.1959–1963, 2012.
- VIDAL, A.H.; BATISTA, A.M.; SILVA, E.C.B. DA; GOMES, W.A.; PELINCA, M.A.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm Cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.109, p.47–51, 2013.
- XAVIER, M.N.; MOUSTACAS, V.S.; CARVALHO JÚNIOR, C.A. Avaliação de diferentes antibióticos na inibição do crescimento de *Brucella ovis* em sêmen ovino congelado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Anais... Belo Horizonte: CBRA.
- YODMINGKWAN, P.; GUNTAPROM, S.; JAKSAMRIT, J.; LETCHUNHAKIAT, K. Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v.11, p.125–130, 2016.