

TECNOLOGIA DE SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CAPRINOS

[Semen processing and artificial insemination in goats]

Marciane da Silva Maia¹

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte - EMPARN – RN. Autor para correspondência: E-mail: marcianemaia@yahoo.com.br

Resumo - A inseminação artificial (IA) é a técnica de reprodução assistida, mais antiga e mais utilizada na produção animal. Associada à preservação dos espermatozoides, a inseminação artificial, oferece muitas vantagens aos criadores, uma vez que possibilita acelerar o melhoramento genético do rebanho, controlar as doenças sexualmente transmitidas, bem como, preservar o material genético de raças ameaçadas de extinção. No entanto, em caprinos a técnica é pouco difundida comparada com outras espécies. Isso se deve em parte aos resultados de fertilidade irregulares e geralmente, baixos obtidos com o uso de sêmen congelado. Os avanços recentes nesta tecnologia têm-se concentrado principalmente na preservação da viabilidade / capacidade fertilizante dos espermatozoides, melhorando a composição dos diluidores e alterando protocolos de refrigeração / congelamento e nas técnicas de avaliação da qualidade espermática, com o objetivo de prever a fertilidade do sêmen. O artigo discute as tecnologias atualmente utilizadas no processamento do sêmen e seus efeitos sobre a qualidade do sêmen, bem como as técnicas de IA aplicadas em pequenos ruminantes e suas taxas de sucesso.

Palavras-Chave: inseminação artificial; cabra; criopreservação; diluidor; pequeno ruminante.

Abstract - Artificial insemination (AI) is the oldest and most widely used assisted reproductive technique applied in livestock production. Associated with preservation of sperm, artificial insemination, offers many advantages to farmers, since it allows accelerating the genetic improvement of the herd, control sexually transmitted diseases, as well as preserve of the genetic material of endangered breeds. However, in goats this technique is little used compared to other species. This is due to, in part, to the fertility results irregular and generally low obtained with the use of frozen semen. Recent advances in this technology have been focused primarily on preserving the viability / fertilizing capacity of sperm by improving the composition of extenders and by changing cooling / freezing protocols and in the sperm assessment techniques predictive to field fertility. The other main issue is the development of minimally invasive techniques for proper deposition of semen. This paper discusses the technology currently used in the semen processing and its effects on semen quality, as well as of the AI techniques applied in small ruminants and their success rates.

Keywords: artificial insemination; doe; semen quality; cryopreservation; extender; small ruminant.

INTRODUÇÃO

Desde que Lazzaro Spallanzani em 1780 provou que era possível ocorrer fecundação depois da deposição do sêmen, de forma artificial, no genital feminino, as biotécnicas relacionadas à reprodução têm evoluído. No início, o sêmen era utilizado na sua forma “in natura” e apenas fracionado e depositado no fundo da vagina da fêmea, obtendo-se taxas de fertilidade razoável. Porém, com o passar dos anos os estudos foram evoluindo e surgiu a necessidade de se aumentar a capacidade fecundante dos reprodutores e de conservar o material seminal por um maior período de tempo.

Passou-se então, a uma nova etapa - a da utilização de diluentes e da criopreservação do sêmen.

No entanto, para assegurar o mínimo de sucesso na criopreservação, não apenas a composição do diluidor, a taxa de diluição e a curva de congelamento/descongelamento são importantes, como também o conhecimento da fisiologia espermática da espécie em questão. O caprino é um exemplo disso, uma vez que ocorre uma interação entre as secreções da glândula bulbouretral e os componentes do diluidor, gema de ovo e leite, gerando substâncias tóxicas ao espermatozoide, o que não ocorre em outras espécies.

Apesar das dificuldades no processamento do sêmen caprino, a disponibilização de sêmen refrigerado ou congelado de boa qualidade, para uso na inseminação artificial, é um desafio aos pesquisadores da área, uma vez que a IA proporciona muitas vantagens aos criadores, em relação à monta natural. No entanto, a fertilidade das cabras após a IA é afetada por vários fatores, entre eles o estresse, gerado com a manipulação dos animais, o sistema de criação da fazenda, o reprodutor, o tipo de sêmen, o estado nutricional da fêmea, produção de leite, número de parições prévias, o local de deposição do sêmen, n° espermatozoide/dose, tipo de estro (natural ou sincronizado), método de sincronização do estro, fatores ambientais (estação do ano), etc.

Devido às particularidades inerentes à espécie caprina, pretendemos neste artigo discutir as tecnologias atualmente utilizadas no processamento do sêmen e seus efeitos sobre a qualidade espermática, bem como as técnicas de IA aplicadas em caprinos e suas taxas de sucesso. Para maior aprofundamento, diversas revisões cobrindo vários aspectos desse tema estão disponíveis na literatura científica (Cseh et al., 2012; Nunes e Salgueiro, 2011; Guerra et al., 2009; Purdy, 2006).

PRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

Três formas de utilização do sêmen caprino são adotadas mundialmente: fresco, refrigerado e congelado. O sêmen fresco é preferido, quando o macho está presente no rebanho, e se tem um grande número de fêmeas em estro, natural ou sincronizado, inviabilizando a monta natural. A utilização de sêmen refrigerado é uma estratégia comum nos casos em que um macho em particular é compartilhado por um grupo de criadores localizados dentro de uma área relativamente pequena. Em tais casos, o sêmen é armazenado a ~ 4 °C e pode ser utilizado até 24 horas a partir da coleta. Por fim, o sêmen é congelado para a preservação em longo prazo, permitindo que ele seja distribuído por uma área mais ampla e usado por tempo indeterminado (Baldassarre e Karatzas, 2004).

O principal problema para a preservação do sêmen caprino em baixas temperaturas são os componentes do plasma seminal, que prejudicam a viabilidade dos espermatozoides armazenados em meios que contenham leite ou gema de ovo. A interação tóxica com a gema de ovo é devido a uma enzima, fosfolipase A ou lecitinase, segregada pela glândula bulbouretral, que coagula a gema de ovo e hidrolisa a lecitina a ácidos graxos e lisolecitinas, que são espermicidas (Roy, 1957). A secreção da glândula Bulbouretral também tem uma interação tóxica com o leite. Este efeito é causado por uma

glicoproteína conhecida como SBU-III (Nunes et al., 1982). Esta enzima hidrolisa os triglicerídeos do leite em ácidos graxos livres que inibem a motilidade espermática e induzem a reação acrossomal (Nunes e Salgueiro, 2011; Purdy, 2006; Guerra et al., 2009; Cseh et al., 2012). É provável que a fosfolipase A e a SBU-III sejam a mesma molécula. No entanto, independente do mecanismo de ação, sua ativação nos diluentes é prejudicial à qualidade da célula espermática durante a refrigeração e criopreservação (Purdy, 2006).

Para superar a interação prejudicial entre o plasma seminal e os componentes do diluidor (gema de ovo ou leite) o ejaculado é diluído em uma solução tamponada e submetido à centrifugação para remoção do plasma seminal. Geralmente as células são lavadas uma ou duas vezes, por 10-15 minutos a 600 x g (Cseh et al., 2012; Purdy, 2006; Chemineau et al., 1991). No entanto, se realizada inadequadamente, a lavagem pode danificar as células. Os resultados quanto ao efeito da lavagem sobre a qualidade do sêmen caprino são contraditórios. Alguns estudos mostram que a remoção do plasma seminal é benéfica para a motilidade e integridade de membranas do espermatozoide caprino refrigerado ou criopreservado (Salvador et al., 2006; Ritar e Salamon, 1982). Enquanto outros mostram que a lavagem do sêmen não afeta a viabilidade espermática do sêmen refrigerado ou congelado (Peterson et al., 2007; Viana et al., 2006).

SÊMEN REFRIGERADO

Na preservação do sêmen pelo método da refrigeração os espermatozoides são armazenados a temperaturas baixas o suficiente para deprimir o seu metabolismo (5 ou 15 °C) prolongando assim a sua vida fértil. No entanto, o processo de refrigeração pode afetar significativamente a viabilidade celular devido ao efeito prejudicial do choque térmico pelo frio. Esse fenômeno ocorre quando o sêmen é resfriado rapidamente entre 30°C e 0° C. A mudança rápida de temperatura, nessa faixa, induz estresse na membrana plasmática e acrossomal, repercutindo na motilidade espermática e na capacidade fecundante do espermatozoide. Este efeito pode ser parcialmente superado pelo resfriamento gradual do sêmen da temperatura ambiente à temperatura de armazenamento e pela suplementação do diluente com alguns aditivos, como a gema de ovo (Holt, 2000; Salamon e Maxwell 2000; Watson, 2000).

Após a diluição, o sêmen é resfriado progressivamente da temperatura de coleta até a temperatura de armazenamento (+15 °C ou +5 °C) durante um período de 1,5 a 4 horas e deve ser utilizado no prazo de 8-12 h, uma vez que a

fertilidade diminui gradualmente durante o armazenamento (Salamon e Maxwell, 2000; Chemineau et al., 1991). Diversos estudos com sêmen caprino armazenado na forma líquida, mantidos a temperaturas entre 4 e 18 °C, demonstraram que a motilidade espermática declina lentamente nas primeiras 24 horas de armazenagem e a partir daí sofre um declínio rápido (Nunes e Salgueiro, 2011; Peterson et al., 2007; Salvador et al., 2006; Viana et al., 2006). No entanto, nesses estudos a fertilidade após IA cervical variou de 41 a 73%. Peterson et al., (2007) observaram que a taxa de prenhez obtida após IA teve uma baixa correlação ($r=0,36$) com a porcentagem de células móveis no ejaculado, sendo que esperava uma maior correlação entre os dois parâmetros, mais estudos devem ser realizados para avaliar a confiabilidade desse resultado.

Embora a fertilidade após a IA possa ser mantida durante preservação nas temperaturas de refrigeração por várias horas, o armazenamento prolongado reduz a fertilidade dos espermatozoides. Em geral, os espermatozoides deterioram, com o aumento da duração do armazenamento independentemente do diluente ou da temperatura de armazenamento. As razões fisiológicas para o rápido declínio da fertilidade do espermatozoide armazenado na forma líquida são o estresse oxidativo extracelular, os efeitos do plasma seminal e produção de radicais livres endógenos (Anel et al., 2006).

Uma alternativa para evitar o efeito dos produtos metabólicos tóxicos é a adição de antioxidantes ao meio de conservação do sêmen. Os espermatozoides são caracterizados por uma capacidade incomum gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e por possuir um sistema de defesa enzimático deficiente, em decorrência da ausência de citoplasma celular. O excesso de ROS causa peroxidação lipídica, declínio no metabolismo de energia do espermatozoide, na motilidade e viabilidade espermática e a fragmentação do DNA, podendo comprometer a viabilidade dos embriões (revisado por Maia e Bicudo, 2009).

Além disso, durante o armazenamento em estado líquido, o espermatozoide normalmente passa por uma sedimentação, o que pode provocar grandes flutuações de pH e um aumento local da concentração de produtos metabólicos tóxicos (ROS). O estado sólido do meio de armazenamento pode evitar a sedimentação dos espermatozoides reduzindo mudanças nas condições químicas locais e também diminuindo o consumo metabólico dos espermatozoides móveis (Yániz et al., 2005). Assim, Salvador et al., (2006) avaliou o efeito da adição de gelatina ao diluidor a base de leite na sobrevivência e fertilidade do espermatozoide

caprino. O uso de gelatina no meio melhorou a motilidade do espermatozoide armazenado a 5°C por 72 horas, no entanto não afetou a fertilidade após IA cervical, comparado ao sêmen armazenado (ambos por 18-20 h) no diluidor leite sem gelatina.

Uma grande variedade de diluentes, combinando vários componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, etc) têm sido desenvolvidos para tornar viável o armazenamento de sêmen refrigerado. Porém, TRIS e leite desnatado são os componentes básicos dos diluentes recomendados para o uso rotineiro na preservação do sêmen de bode (Chemineau et al., 1991; Evans e Maxwell, 1987).

Diluentes alternativos que minimizem a interação entre espermatozoides e lipases têm sido propostos, incluindo os diluentes quimicamente definidos, sem adição de produtos de origem animal (Mara et al., 2007; Khalifa e El-Said, 2006) e aqueles a base de água de coco. Nunes e Salgueiro (2011) demonstraram que o espermatozoide caprino diluído com água de coco e refrigerado a 4 °C mantém alta motilidade progressiva durante 24 horas e proporciona uma fertilidade após IA com estro sincronizado, superior a 60%.

SÊMEN CONGELADO

O grande avanço na criopreservação do espermatozoide de mamíferos só foi dado com a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol por Polge et al. (1949). A partir daí, o espermatozoide de várias espécies tem sido criopreservado com sucesso. Entretanto, o sucesso da criopreservação de sêmen é apenas parcial, uma vez que cerca da metade dos espermatozoides são destruídos ou danificados pela congelação e descongelação. Isso ocorre porque durante o processo de criopreservação a célula passa por uma série de alterações estruturais, causadas pelo gradiente osmótico, gerado entre o meio intra e extracelular, resultando em danos a membrana plasmática e acrossomal, bem como a outras estruturas espermáticas (Mazur, 1984; Watson, 1995; 2000).

Após a diluição e resfriamento, o sêmen pode ser congelado em palhetas (0,25 ou 0,50 ml) ou na forma de pellets. A congelação em palhetas pode ser feita usando uma máquina de congelação automática ou sobre o vapor de nitrogênio líquido. Congeladores automáticos tem a vantagem de permitir o congelamento de grandes quantidades de palhetas por vez e o controle da curva de congelação (Purdy, 2006; Chemineau et al., 1991). Tradicionalmente, as palhetas são descongeladas em água morna (37 °C) por 30 segundos.

A criopreservação compromete a fertilidade do espermatozoide caprino sendo um dos motivos

alegados para a baixa taxa de prenhez após a inseminação artificial cervical com sêmen congelado. Para reduzir o efeito da crioinjúria ao espermatozoide vários métodos de processamento e congelamento tem sido desenvolvidos. Principalmente, relativos a diferentes combinações de componentes no diluidor, crioprotetores e curvas de congelação/descongelação.

A finalidade de um diluente de criopreservação é suprir as células espermáticas com uma fonte de energia, proteger contra os danos relacionados com a temperatura e manter um ambiente adequado para o espermatozoide sobreviver temporariamente (Purdy, 2006). Geralmente, os meios de criopreservação de sêmen caprino incluem um crioprotetor não penetrante (leite ou gema de ovo), um crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfoxido – DMSO), um tampão (Tris ou Test) um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), um sal (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina, etc.) (Purdy, 2006).

Para minimizar o estresse físico e químico resultante do resfriamento, congelação e descongelação adiciona-se um crioprotetor ao meio de criopreservação. Muitos crioprotetores penetrantes (glicerol, dimetil sulfoxido, etileno glicol e propileno glicol) têm sido testados no espermatozóide caprino, mas, o mais usado é o glicerol (Purdy, 2006). A sobrevivência da célula pode ser afetada pelo modo como o glicerol é adicionado ao diluente. Assim, a adição de glicerol pode ser feita em uma, duas ou três etapas a 37 °C ou 5 °C. No entanto, a concentração final do crioprotetor em um meio é determinada pela toxicidade do químico e seu efeito benéfico sobre o espermatozóide. Glicerol, DMSO e etilenoglicol, geralmente são usados em concentrações que variam de 1-8%, mas, a maior recuperação de espermatozoide tem sido conseguida com glicerol (Purdy, 2006). Bittencourt et al. (2004) avaliaram a ação do glicerol e etilenoglicol (ambos a 7%) como crioprotetores do espermatozoide caprino, observando que apesar do etilenoglicol ter protegido melhor a célula quanto as características morfológicas e de integridade de membrana plasmática o mesmo afetou severamente a motilidade espermática (10% móveis pós descongelação) provavelmente por ter sido tóxico ao espermatozoide. Já o glicerol proporcionou melhor taxa de motilidade à descongelação (51%). Peterson et al. (2007) observaram efeito tóxico do glicerol (4,0 %) sobre a motilidade espermática no sêmen armazenado por 24 horas a 18 °C. Observaram ainda que o efeito do glicerol varia entre animais. Em três bodes, a motilidade do

espermatozoide tinha desaparecido completamente dentro de 24 horas de armazenamento.

Os diluidores Tris-glicose-gema e leite em pó desnatado, glicosado são os mais comumente usados para a criopreservação de sêmen caprino (Purdy, 2006). Modificações desses diluentes têm sido investigadas com resultados variados. Dorado et al. (2007) comparam a capacidade fecundante do espermatozoide caprino criopreservado em diluidor a base de TRIS e leite desnatado, ambos com 20% de gema de ovo, e concluíram que os parâmetros cinemáticos da motilidade espermática e a integridade acrossomal, após uma hora de incubação foram aceitáveis em ambos os diluidores, embora o diluidor TRIS tenha demonstrado superioridade em alguns parâmetros. No entanto, o experimento *in vivo* não confirmaram a superioridade do diluidor TRIS ou leite, indicando que qualquer um dos dois diluidores pode ser usado na criopreservação do sêmen caprino para ser usado na inseminação cervical porque ambos mantiveram viabilidade espermática aceitável e capacidade fertilizante. Já Peterson et al (2007) utilizando esses mesmos diluidores observaram que o tipo do diluidor não afeta a qualidade espermática antes da congelação. No entanto, o diluidor a base de Tris – gema proporcionou maior percentual de espermatozoide vivo com acrossoma intacto após a descongelação que o leite glicosado.

A adição de antioxidantes ao diluidor tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide caprino do efeito tóxico dos metabólitos reativos do oxigênio. Atessahin et al., (2008) avaliaram o efeito de doses crescentes de taurina, cisteína e trealose na qualidade do sêmen descongelado e observaram que os antioxidantes não melhoraram a motilidade espermática nem a integridade acrossomal, quando comparado ao controle. Bucak et al., (2009) avaliaram o efeito dos antioxidantes glutamina e ácido hialurônico sobre a motilidade e viabilidade do espermatozoide criopreservado em diluidor a base de Tris, e relataram que nenhuma diferença foi observada na porcentagem de acrossomos danificados e espermatozoides anormais após a suplementação com os antioxidantes. No entanto, a adição de glutamina promoveu um aumento na motilidade espermática e integridade de membrana. Já Sinha et al. (1996) observaram um efeito benéfico da adição de glutatona ao diluente de congelação, aumentando a motilidade e diminuindo a porcentagem de anormalidades acrossomais no espermatozoide descongelado. A taxa de fertilidade do sêmen congelado na presença de glutatona foi maior, mas não significativamente, do que aquela observada para o sêmen congelado apenas em Tris.

O efeito dos antioxidantes sobre a função espermática também é observado quando este é adicionado tanto durante a colheita do sêmen (Yamashiro et al., 2006) quanto após a sua descongelamento (Gadea et al., 2013). Segundo Yamashiro et al. (2006) a adição de diluente aditivado com BSA, ao tubo de coleta, melhorou a congelabilidade do sêmen caprino. Enquanto que Gadea et al. (2013) observaram que a adição de Glutathione ao sêmen após a descongelamento melhorou tanto a função quanto a capacidade fertilizante do espermatozoide criopreservado.

Uma inovação recente no processamento de sêmen caprino é o desenvolvimento de um protocolo de congelamento para sêmen colhido por eletroejaculação (EE) (Jiménez-Rabadán et al., 2013). Após avaliarem o efeito de diferentes fatores envolvidos no processo de congelamento, o protocolo que resultou em sêmen de melhor qualidade após a descongelamento foi o que incluiu 20% de gema de ovo, curva de refrigeração lenta (90 min), glicerol (7%) adicionado à 30° ou 5°C e tempo de equilíbrio 3 horas. Sob tais condições a qualidade espermática pós-descongelamento foi semelhante àquela do sêmen colhido em vagina artificial (VA). No entanto, a fertilidade “in vitro” foi significativamente, maior (35%) para o sêmen colhido por EE que para aquele colhido em VA (28%). Um protocolo adequado à criopreservação de sêmen colhido por eletroejaculação permitirá o processamento do sêmen de animais não treinados para VA, de machos mais arreados como aqueles criados extensivamente, assim como de animais selvagens.

MÉTODOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Basicamente três técnicas de inseminação são usadas em caprinos: vaginal, cervical (transcervical) e intrauterina (laparoscopia). Usando sêmen fresco, as técnicas de inseminação vaginal ou cervical (deposição do sêmen intracervical) resultam em altas taxas de prenhez, semelhantes às obtidas na monta natural. Porém, com sêmen congelado o único meio de atingir taxas de prenhez aceitáveis é com a deposição intrauterina do sêmen, seja por laparoscopia ou pela via transcervical.

INSEMINAÇÃO VAGINAL

O procedimento é rápido, de fácil execução em condições de campo e pode resultar em taxas de prenhez de 30 a 50%. A inseminação intravaginal é eficaz na cabra quando esta é inseminada com sêmen fresco, mas dá baixos resultados com sêmen refrigerado ou sêmen congelado. Após a detecção do estro natural, as fêmeas devem ser inseminadas pelo menos 12 horas após a primeira observação de cio (durante a segunda metade do período de estro). Se a cabra permanece em cio 12-24 h após a

inseminação é aconselhável inseminá-la novamente. O volume de sêmen e o número de espermatozoides progressivamente móveis recomendado para o uso são 0,2 mL e 400×10^6 espermatozoides (mínimo), respectivamente (Cseh et al., 2012). Utilizando sêmen fresco diluído, com 200×10^6 spz/dose, Paulenz et al. (2005) observaram que a taxa de prenhez após IA vaginal (74,3%) não diferiu daquela da IA com deposição cervical (78%).

INSEMINAÇÃO CERVICAL (TRANSCERVICAL, INTRACERVICAL)

Na cabra, a deposição intrauterina de sêmen pode ser conseguida na inseminação cervical em 50-60% das fêmeas, uma vez que a cérvix caprina é relativamente fácil de atravessar. Em ciclos sincronizados, o momento ideal para uma única inseminação (sêmen refrigerado ou congelado) é de aproximadamente 45 horas após a remoção do implante, enquanto inseminações duplas devem ocorrer as 30 e 48 horas após a remoção da fonte de progesterona (Cseh et al., 2012).

Embora na IA Cervical o sêmen possa ser depositado no corpo do útero, a deposição cervical cranial produz resultados satisfatórios. Em inseminação cervical, com estro sincronizado, utilizando sêmen diluído em água de coco e mantido a 37 °C, Maia e Santos (2010) obtiveram uma taxa de prenhez de 62,9% quando a deposição foi cervical profunda e 42,4% na deposição intrauterina. Sugerindo que a manipulação excessiva na tentativa de ultrapassar a cérvix pode reduzir a fertilidade. Em cabras nulíparas Houdeau et al. (2008) observaram que quanto mais rápido a IA foi realizada maior foi a taxa de prenhez. Na deposição intracervical rápida (20 segundos) a taxa de prenhez foi 61,0% enquanto que quando a IA foi mais demorada (60 segundos) a taxa de prenhez foi 50,7%. Segundo os autores, a deposição rápida do sêmen limita o reflexo que ativa as contrações uterinas, provocado pela inserção do espéculo e movimentos do aplicador e com isso melhora a fertilidade.

Batista et al. (2011) compararam a taxa de prenhez de cabras inseminadas pela via cervical com sêmen fresco e congelado e observaram que aos 35 dias a taxa de prenhez foi significativamente maior (73,3%) utilizando sêmen fresco que com sêmen criopreservado (46,7%).

INSEMINAÇÃO INTRAUTERINA (LAPAROSCÓPICA)

A inseminação intrauterina laparoscópica foi desenvolvida para superar muitas das dificuldades da inseminação intravaginal ou intracervical. O

número de espermatozoides necessários para cada inseminação é mais baixo e o volume inseminante é proporcionalmente maior, permitindo taxas de diluição mais adequadas e, por conseguinte, uma melhor preservação / proteção dos espermatozoides durante a criopreservação. Como consequência, a inseminação intrauterina laparoscópica melhora as taxas de prenhez obtidos com sêmen congelado. As taxas de concepção são mais elevadas (60-80%) do que na inseminação intracervical com sêmen congelado e semelhantes as da monta natural após sincronização do estro. As técnicas atuais recomendam inseminar metade da dose total de sêmen na região central de cada trompa uterina sem levar em conta o local de ovulação (Cseh et al., 2012).

As desvantagens incluem a exigência de equipamento laparoscópico sofisticado, realização de cirurgia invasiva e necessidade de maior conhecimento técnico para realizar o procedimento.

Na cabra, o número de espermatozoides é de 20×10^6 (no mínimo) por dose inseminante e o momento ideal da inseminação é entre 43 e 46 h após a retirada dos implantes de progesterona (Cseh et al., 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial pode dar uma grande contribuição ao desenvolvimento da caprinocultura brasileira, uma vez que oferece suporte ao melhoramento genético rápido, disseminação de genética de alto valor, controle das doenças sexualmente transmissíveis e preservação de raças. No entanto, o sucesso da técnica depende, entre outros fatores, da qualidade do sêmen utilizado. Assim uma boa avaliação seminal é de fundamental importância para a seleção do sêmen a ser utilizado.

As técnicas rotineiras de avaliação da função espermática no sêmen fresco ou processado, não são capazes de prever com segurança a fertilidade “*in vivo*” após a inseminação. No entanto, técnicas modernas de avaliação espermática têm possibilitado avanço nessa questão. A integridade do DNA, alguns parâmetros da avaliação computadorizada da motilidade espermática, bem como os testes de viabilidade espermática (Berlinguer et al., 2009) têm demonstrado alto valor preditivo da capacidade fertilizante do sêmen congelado. O uso rotineiro dessas avaliações permitirá uma melhor seleção dos doadores de sêmen para congelamento, assim como das partidas/amostras de sêmen a serem utilizadas na IA com maior garantia de sucesso.

REFERÊNCIAS

- Anel, L.; Alvarez, M.; Martinez-Pastor, F.; Garcia-Macias, V.; Anel, E.; Paz, P. Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41 (Suppl. 2), p. 30–42, 2006.
- Atessahin, A.; Bucak, M.N.; Tuncer, P.B.; Kizil, M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, v.77, p. 38-44, 2008.
- Baldassarre, H.; Karatzas, C.N. Advanced assisted reproduction Technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, v. 82–83, p. 255–266, 2004.
- Batista, M.; Niño, T.; Santana, M.; Alamo, D.; Castro, N.; Reyes, R.; González, F.; Cabrera, F.; Gracia, A. Influence of the Preservation Temperature (37, 20, 4, -196 °C) and the Mixing of Semen over Sperm Quality of Majorera Bucks. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, p. 281–288, 2011.
- Berlinguer, F.; Madeddu, M.; Pasciu, V.; Succu, S.; Spezzigu, A.; Satta, V.; Mereu, P.; Leoni, G. G.; Naitana, S. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 7, n. 125, 9 p. 2009. Doi: 10.1186/1477-7827-7-125
- Bittencourt, R.F.; Ribeiro, A.L.; Santos, A.D.F.; Furst, R.; Teixeira, R.B.S.; Chalhoub, M.; Portela, A.P.; Alves, S.G.G.; Almeida, A.K.; Guimaraes, J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelamento do sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.
- Bucak, M.N.; Sariözkan, S.; Tuncer, P.B.; Ulutas, P. A.; Akaçadag, H.I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.81, p. 90-95, 2009.
- Chemineau, P.; Cagnié, Y.; Guérin, Y.; Orgeur, P.; Vallet, J.-C. *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. Rome: FAO, 1991. 222 p. (FAO - Animal Production and Health, Nº. 83).
- Cseh, S.; Faigl, V.; Amiridis, G.S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v. 130, p. 187– 192, 2012.
- Dorado, J.; Rodríguez, 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, 2007.
- Evans, G.; Maxwell, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney: Butterworths, 1987. 194p.
- Gadea, J.; Gumbao, D.; Gómez-Giménez, B.; Gardón, J.C. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive Biology*, v. 13, p. 24– 33, 2013.
- Guerra, M.M.P.; Souza, A.F.; Soares, A.T.; César, C.N.R.; Silva, S.V.; Batista, A.M. Aspectos críticos da congelamento do sêmen caprino. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009. Belo Horizonte, MG. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2009. (CD-ROM)
- Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p. 3-22, 2000.

- Houdeau, E.; Furstoss, V.; Forgerit, Y.; Bonne, J. L.; Leboeuf, B. Short-duration insemination with frozen semen increases fertility rate in nulliparous dairy goats. *Animal*, v.2, n.10, p.1496-1500, 2008.
- Jiménez-Rabadán, P.; Ramón, M.; García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Álvaro-García, P.J.; Olmo, E.; Pérez-Guzmán, M.D.; Fernández-Santos, M.R.; Garde, J.J.; Soler, A.J. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. *Cryobiology*, v. 67, p. 251-257, 2013.
- Khalifa, T.A.A., El-Saidy, B.E. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Animal Reproduction Science*, v. 93, p. 303-315, 2006
- Maia, M.S.; Bicudo, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- Maia, M. S.; Santos, L. P. Taxa de prenhez em cabras após a inseminação artificial com sêmen fresco. *Revista Eletrônica Centauro*, v.1, n.1, p.10-18, 2010. Disponível em: http://www.crmvm.org.br/crmv/arquivos/taxa_de_prenhez_em_cabras_apos_a_inseminacao_artificial_com_semen_fresco.pdf
- Mara, L.; Dattena, M.; Pilichi, S.; Sanna, D.; Branca, A.; Cappai, P. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 102, p. 152-157, 2007.
- Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, v.247, n.3, pt.1, p. C125-C142, 1984.
- Nunes, J.F.; Corteel, J.M.; Combarous, Y.; Baril, G. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction, nutrition, development*, v.22, p. 611-620, 1982.
- 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.
- Paulenz, H.; Söderquist, L.; Adnøy, T.; Soltun, K.; Sæther, P.A.; Fjellsøy, K.R.; Berg, K.A. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Animal Reproduction Science*, v.86, p.109-117, 2005.
- Peterson, K.; Kappen, M.A.P.M.; Ursem, P.J.F.; Nöthling, J.O.; Colenbrander, B.; Gadella, B.M. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*, v. 67, p. 863-871, 2007.
- Polge, C.; Smith, A.U.; Parkes, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.169, p.626-627, 1949.
- Purdy, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 215-225, 2006.
- Ritar, A.J.; Salamon, S. Effects of seminal plasma and of its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of Angora Goat. *Australian Journal of Biological Science*, v. 35, p.305-12, 1982.
- Roy, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, v. 179, p. 318-319, 1957.
- Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 37, p.185-249, 1995.
- Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p. 77-111, 2000.
- Salvador, I.; Yániz, J.; Viudes-De-Castro, M.P.; Gómez, E.A.; Silvestre, M.A. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. *Theriogenology*, v. 66, p.974-981, 2006.
- Sinha, M.P.; Sinha, A.K.; Singh, B.K.; Prasad, R.L. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, v. 41, p. 237-243, 1996.
- Viana, A.K.S.; Chalhoub, B.; Ribeiro Filho, A.L.; Almeida, A.K.; Portela, A.P.M.; Bittencourt, R.F.; Alves, S.G.G.; Bittencourt, T.C.C.; Quintela, A.T. Avaliação in vitro do semen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*, v.7, p.67-76, 2006.
- Yamashiro, H.; Wang, H.; Yamashita, Y.; Kumamoto, K.; Terada, T. enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, n.3, p. 407-414, 2006.
- Yániz J, Martí Ji, Silvestre Ma, Folch J, Santolaria P, Alabart JI, et al. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 °C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, v. 64, p. 1844-51, 2005.
- Watson, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p. 871-891, 1995.
- Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p. 481-492, 2000.