

CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN CAPRINO CONGELADO: INFLUÊNCIA DO TIPO DE PALHETA E CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA¹

Hymerson Costa Azevedo²; Rui Machado³; Aurino Alves Simplício⁴; Adriana Trindade Soares⁵.

RESUMO : Foram congeladas 259 doses de sêmen de reprodutores das várias raças caprinas em palhetas de 0,25 e 0,5 ml com concentrações de 50, 100 e 200 x 10⁶ espermatozoides viáveis/dose e, avaliadas quanto à motilidade individual progressiva (MIP), vigor e taxa de degradação espermática, porcentagem de espermatozoides vivos e níveis de transaminases extracelulares (AST e ALT). O tipo de palheta não teve influência sobre a MIP e nem sobre o vigor espermático. O sêmen congelado em palhetas de 0,25 ml apresentou maior taxa de degradação aos 90 e 120 minutos de incubação, menor número de espermatozoides vivos e maior concentração de ALT que aquele congelado em palhetas de 0,5 ml. A concentração espermática teve influência apenas nos níveis de AST. Conclui-se que dentro do protocolo de congelamento adotado os espermatozoides envasados em palhetas de 0,25 ml apresentaram maiores danos que aqueles envasados em palhetas de 0,5 ml e que a redução da concentração espermática manteve a qualidade in vitro do sêmen caprino congelado.

Palavras-Chave: caprinos, sêmen, inseminação artificial; palheta, concentração espermática.

CARACTERISTICS OF THE GOAT FROZEN SEMEN: INFLUENCE OF STRAW AND SPERMATIC CONCENTRATION

ABSTRACT : Two hundred and fifty nine semen doses from bucks of several breeds were frozen in 0.5 and 0.25 french straws with concentrations of 50, 100 and 200 x 10⁶ viable spermatozoa/dose. Those semen doses were evaluated for their post-thaw individual progressive motility (MIP), motility rate, degradation spermatic rate, percentage of live spermatozoa and levels of extracellular transaminases (AST and ALT). The kind of straw didn't have influence on MIP and motility rate. The semen frozen in 0.25 straws showed higher degradation rate at 90 and 120 minutes of incubation time, lower number of live spermatozoa and higher concentrations of ALT than semen frozen in 0.5 straws. The spermatic concentration just had influenced the AST levels. Higher spermatic concentration increased AST levels. It was concluded that spermatozoa frozen in 0.25 ml straws were more damaged those frozen in 0.5 ml straws. On the other hand, the reduction in spermatic concentration preserved the quality of goat frozen semen.

Key Words: goat, semen, artificial insemination, straws, and spermatic concentration.

¹Trabalho extraído de Tese de Mestrado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e financiado pela EMBRAPA - Caprinos

²Méd. Vet., MSc, EMBRAPA - Tabuleiros Costeiros. Cx. Postal 44, 49001-970, Aracajú - SE, hymerson @cpac.embrapa.br

³Méd. Vet., MSc, EMBRAPA - Pecuária Sudeste. Cx. Postal 339,13560-970, São Carlos-SP, rui@cnpse.embrapa.br

⁴Méd. Vet., PhD, EMBRAPA - Caprinos. Cx. Postal D-10,62011-970 - Sobral-CE, asimplic@cnpce.embrapa.br

⁵Méd. Vet., MSc, EMBRAPA - Caprinos. Cx. Postal D - 10, 62011 - 970 - Sobral.

INTRODUÇÃO

A utilização de palhetas de 0,25ml em substituição às de 0,5ml possui algumas vantagens como: aumento da capacidade de armazenagem do sêmen; redução da quantidade de diluidor, o qual funcionaria como corpo estranho e levaria a uma resposta imunológica por parte da fêmea e utilização de equipamentos e volumes mais adequados às dimensões anatômicas do genital feminino caprino diante da dificuldade no franqueamento e pequena capacidade volumétrica da cérvix.

Injúria e morte dos espermatozóides quando submetidos à congelação pode ser causada pela formação de cristais de gelo no interior das células espermáticas. Este fenômeno físico ocorre quando rápidas taxas de resfriamento são usadas. Outro fenômeno lesivo ao espermatozóide é o desenvolvimento de regiões com elevada concentração de soluto, que desidratam a célula quando taxas lentas de resfriamento são empregadas (SENGER, 1986). Quanto maior a relação superfície/volume da unidade de envase, maior serão as mudanças de temperatura por unidade de tempo (SENGER *et al.*, 1983; SENGER, 1986; MAXWELL *et al.*, 1995). Conseqüentemente espermatozóides em palhetas menores, tais como as de 0,25 ml, que possuem uma relação superfície/volume significativamente maior que as de 0,5 ml, podem ser mais susceptíveis às mudanças de temperatura (PICKETT & BERNDTSON, 1974; SENGER *et al.*, 1983; MAXWELL *et al.*, 1995).

A velocidade de congelação é responsável pela cristalização ou vitrificação da água intra-espermática. Se há uma congelação mais lenta, a cristalização da água livre extra-espermática, dá origem à uma exsmose e desidratação da célula espermática. A congelação rápida evita esta desidratação dos espermatozóides, e conseqüentemente menos dano à célula (SMIRNOV, 1976).

Outro parâmetro de eficiência a ser considerado no processamento do sêmen é o número mínimo de espermatozóides móveis que deverá conter na dose inseminante, importante para a utilização mais ampla do sêmen de pequenos ruminantes já que torna muito mais efetivo o aproveitamento de ejaculados (NEVES *et al.*, 1983; LAWRENZ, 1987; RITAR & BALL, 1993).

As dimensões anatômicas das vacas permitem, diferentemente da ovelha e da cabra, deposições intra-uterinas via cérvix com maior facilidade, o que possibilita o uso de um número muito menor de espermatozóides. Como em cabras somente uma proporção de cérvix são penetráveis até o útero por pipetas de inseminação, faz-se necessária a deposição de um maior número de espermatozóides por dose (EVANS & MAXWELL, 1987). Não obstante, a elevada concentração espermática, determina uma intensa atividade metabólica com rápido acúmulo de catabólitos no plasma seminal, extremamente prejudiciais à célula espermática (NEVES *et al.*, 1983). A diminuição da concentração, até certos limites, resultaria numa maior proporção diluente/espermatozóide, o que significaria melhor proteção celular (NEVES *et al.*, 1983; SINGH *et al.*, 1993). Elevadas diluições porém não levam a uma congelabilidade ótima (SAHNI & MOHAN, 1990). Segundo ZHIBIN *et al.* (1996), a elevada densidade do sêmen caprino em relação aos outros animais domésticos, favorece a utilização de altas taxas de diluição sem, no entanto, alterar a motilidade espermática. RITAR & BALL (1993), trabalhando com sêmen peletizado, relatam melhores índices de recuperação de espermatozóides pós-descongelação e, de sobrevivência durante a incubação, para o sêmen diluído a taxas maiores.

Na determinação da unidade de envase e concentração espermática a ser utilizada devem ser considerados fatores de congelabilidade, ou seja, da habilidade do sêmen em resistir à congelação e descongelação, característica que sofre importante variação individual (WALLACE, 1992) e, também pode sofrer grande influência da idade dos reprodutores (NAVES *et al.*, 1996) e da raça em que se está trabalhando (SIMPLÍCIO *et al.*, 1999).

Este trabalho teve como objetivo principal verificar a influência da concentração espermática e unidade de envase ou tipo de palheta sobre a qualidade *in vitro* do sêmen caprino congelado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (CNPC) situado no Município de Sobral-CE, sendo o

processamento e análise do sêmen realizados no Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação Artificial do Setor de Reprodução.

Durante todo o período experimental os reprodutores foram mantidos confinados em baias, recebendo ao cocho silagem de milho (*Zea Mays*, Linn.) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) picado, à vontade. Para cada animal, também era administrada diariamente, 400 gramas de uma mistura concentrada à base de milho triturado, farelo de soja (*Glycine hispida*, Maxin.) e sal comum (NaCl), na proporção de 75, 23 e 2%, respectivamente.

Reprodutores das raças: Moxotó, Anglo-nubiana Pardo-alpina e Saanen com idades variando entre 18 e 52 meses, foram selecionados como doadores de sêmen. Os bodes foram submetidos a um exame clínico-andrológico e a, pelo menos, três espermogramas com intervalo de duas semanas entre eles seguindo o protocolo proposto por FONSECA *et al.* (1992). Apenas aqueles indivíduos clinicamente normais, que aceitaram a vagina artificial e que apresentaram um quadro espermático compatível com o processamento no que diz respeito aos aspectos quanti-qualitativos do ejaculado, foram usados como doadores de sêmen.

A coleta e processamento do sêmen foram realizados semanalmente segundo metodologia descrita por SIMPLÍCIO & MACHADO (1989) modificada por AZEVEDO (1996), sendo que o sêmen era envasado em palhetas de 0,25 e de 0,5 ml conservando as concentrações de 50, 100 e 200 milhões de espermatozóides viáveis por dose.

As amostras congeladas foram destinadas à avaliação da capacidade fecundante *in vitro* do sêmen através das provas de termorresistência (TTR), preparação de esfregaço para coloração vital (porcentagem de espermatozóides vivos) e dosagens de transaminases (Aspartato aminotransferase - AST e de Alanino aminotransferase - ALT) no meio extraespermático.

TTR

Após a descongelação das palhetas (37°C por 20 segundos), o sêmen foi removido para tubos de ensaios onde permaneceu em incubação em banho-

maria a 37°C para proceder-se a leitura da motilidade individual progressiva e do vigor dos espermatozóides aos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos. Para a avaliação microscópica da motilidade e do vigor nas palhetas de 0,5ml, simplesmente uma gota do sêmen era colocada entre lâmina e lamínula. Já nas palhetas de 0,25ml, em concentrações mais elevadas, o sêmen era diluído com citrato de sódio a 2,9% afim de facilitar a leitura (sem diluição para 50, com diluição acrescentando-se uma gota de citrato para 100 e duas gotas para 200 milhões de espermatozóides viáveis por dose)

O declínio da MIP durante o período de incubação foi calculado através da taxa de degradação (DEG) aos 30, 60, 90 e 120 minutos semelhante ao que foi descrito por FONSECA *et al.* (1992). A taxa de degradação dada em porcentagem, foi obtida segundo a fórmula:

$$\frac{\text{Motilidade espermática aos } 5' - \text{Motilidade atual (30, 60, 90 ou 120')}}{\text{Motilidade aos } 5'}$$

Vivos e Mortos

A contagem de espermatozóides vivos (VIV) foi realizada pela coloração vital em eosina-nigrosina⁶ e expressa em porcentagem (%). Para a avaliação da porcentagem de espermatozóides vivos duas baterias de amostras foram avaliadas separadamente (VIV-1 e VIV-2).

Transaminases

As quantidades de Aspartato aminotransferase (AST) e de Alanino aminotransferase (ALT) foram quantificadas nas amostras de sêmen congelado. As palhetas foram descongeladas (37°C por 20 segundos) e centrifugadas a 1400 g, durante 15 minutos. Uma vez obtido o sobrenadante (parte acelular), as amostras foram processadas utilizando-se o Sistema Reitman & Frankel⁶, e a leitura da absorvância realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo "Statistical Analysis System" (SAS Institute Inc., 1990) para dados não balanceados (PROC GLM). A significância foi

obtida através do teste F de Fischer, na análise de variância. Quando o efeito estudado era significativo pela análise de variância, seus níveis eram testados pelo teste de Duncan. As características estudadas com valores obtidos em termos percentuais foram transformadas em ângulos pela função arcseno. No modelo utilizado na análise de variância de AST, ALT, porcentagem de espermatozoides vivos (VIV-1 e 2), motilidade individual progressiva (MIP), vigor espermático (VIG) e taxa de degradação (DEG), foram considerados os efeitos classificatórios da raça do reprodutor (GENÓTIPO), volume ou tipo de palheta (VOL) e número de espermatozoides viáveis (SPZV) da dose inseminante, além do efeito linear e quadrático da idade do reprodutor (IDAD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias gerais ($\bar{X} \pm ep$) das avaliações *in vitro* do sêmen foram, respectivamente, $27,53 \pm 1,20\%$ e

do VIG de um modo geral reduzia: $1,62 \pm 0,07$; $1,07 \pm 0,07$; $0,66 \pm 0,07$ e $0,40 \pm 0,06$ aos 30, 60, 90 e 120 minutos respectivamente. De um modo geral, poucas diferenças quanto aos parâmetros *in vitro* do sêmen foram observados para as variáveis estudadas. Os dados obtidos quanto às concentrações das transaminases confirmam os relatos de VARSHNEY *et al.* (1978), SINGH *et al.* (1993) e SANTOS (1995), os quais obtiveram níveis de AST superiores aos de ALT.

Tipo de Palheta

O tipo de palheta não teve influência significativa ($P > 0,05$) sobre a MIP-5 (Quadro I), o que guarda coerência com vários autores (SENGER *et al.*, 1983; HARANATH *et al.*, 1988; FATH-EL-BAB & YASSEN, 1993; MENDEZ *et al.*, 1994), que também não observaram influência da redução do volume da palheta de 0,5 para 0,25 ml sobre a MIP pós-descongelção. Porém FATH-EL-BAB & YASSEN

TABELA I - Médias e erros-padrão das médias (LSM+ep) da motilidade individual progressiva aos 5 minutos de incubação (MIP-5) e da porcentagem de espermatozoides vivos (VIV-2), de acordo com o tipo de palheta e a concentração espermática (número de espermatozoides viáveis por dose)

	VOLUME (ml)		CONCENTRAÇÃO ($\times 10^6$)		
	0,25	0,5	50	100	200
MIP-5	29,19 ^a	28,84 ^a	24,91 ^a	31,76 ^a	30,37 ^a
(%)	(2,16)	(1,71)	(2,37)	(2,05)	(2,45)
VIV-2	42,23 ^a	45,57 ^a	45,96 ^a	41,10 ^a	44,64 ^a
(%)	(2,57)	(2,03)	(2,82)	(2,44)	(2,92)

Valores acompanhados de letras iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan em nível de 5%.

$1,96 \pm 0,06$ para a motilidade individual progressiva e vigor espermático aos 5 minutos pós-descongelção (MIP-5 e VIG-5); $17,90 \pm 3,53\%$, $44,06 \pm 4,10\%$, $65,65 \pm 3,94\%$ e $79,56 \pm 3,25\%$ para a taxa de degradação aos 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação; $51,31 \pm 0,90\%$ e $41,70 \pm 1,43\%$ para a porcentagem de espermatozoides vivos (VIV-1 e VIV-2) e $25,75 \pm 1,75$ U/ml e $5,29 \pm 0,31$ U/ml para as concentrações de AST e ALT mensuradas à descongelção. Observou-se também que a medida que o período de incubação avançava, a avaliação ($\bar{X} \pm ep$)

(1993) e MAXWELL *et al.* (1995), encontraram maior MIP do sêmen bubalino e ovino envasado em palheta média. Por outro lado ainda, SMIRNOV (1976) e MOURA *et al.* (1989) sugerem que melhores resultados em congelção são obtidos em palhetas finas para o sêmen bovino e suíno, respectivamente.

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) também entre as palhetas para a variável VIG (tabela II) em nenhum dos períodos de incubação (VIG-5, 30, 60, 90 e 120).

Ihe confere maior viabilidade. Possivelmente no final da incubação a quantidade de diluidor seja insuficiente para o número de espermatozóides no caso da palheta de 0,25 ml, o que é prejudicial à manutenção da

TABELA II - Médias e erros-padrão das médias (LSM+ep) do vigor espermático (VIG), durante o período de incubação de acordo com o tipo de palheta e a concentração espermática (número de espermatozóides viáveis por dose)

	PALHETA		CONCENTRAÇÃO		
	(ml)		$(\times 10^6)$		
	0,25	0,50	50	100	200
VIG	2,06 ^a	2,01 ^a	1,70 ^b	2,24 ^a	2,17 ^a
5min	(0,10)	(0,08)	(0,11)	(0,10)	(0,12)
VIG	1,76 ^a	1,73 ^a	1,31 ^b	1,87 ^a	2,07 ^a
30min	(0,12)	(0,09)	(0,13)	(0,11)	(0,13)
VIG	1,28 ^a	1,23 ^a	0,84 ^c	1,22 ^b	1,71 ^a
60min	(0,13)	(0,11)	(0,15)	(0,13)	(0,15)
VIG	0,66 ^a	0,88 ^a	0,37 ^c	0,74 ^b	1,20 ^a
90min	(0,13)	(0,10)	(0,14)	(0,12)	(0,14)
VIG	0,55 ^a	0,53 ^a	0,22 ^c	0,54 ^b	0,86 ^a
120min	(0,11)	(0,09)	(0,12)	(0,11)	(0,13)

Valores acompanhados de letras iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan em nível de 5%.

Não foi verificada influência significativa ($P>0,05$) do tipo de palheta, sobre a taxa de degradação aos 30 e 60 minutos de incubação (DEG-30 e 60). Entretanto na avaliação aos 90 e 120 minutos (DEG-90 e 120), a variável tipo de palheta influenciou significativamente ($P<0,05$) a taxa de degradação (Quadro II), sendo maior para o sêmen envasado em palhetas de 0,25 ml. Estes achados se identificam com aqueles reportados por RITAR & BALL (1993) que indicam maior sobrevivência durante a incubação dos espermatozóides caprinos e ovinos diluídos a taxas maiores, porém discordam dos resultados descritos por SENGGER *et al.* (1983) para o sêmen bovino, cujos danos aos espermatozóides foram imediatos (pós-descongelamento) ao invés de latentes, talvez pelo fato do sêmen bovino não ser submetido à lavagem por centrifugação durante o processamento, permanecendo assim com maior quantidade de plasma seminal, o que

viabilidade espermática e proteção celular (NEVES *et al.*, 1983; SINGH *et al.*, 1993).

Na análise dos dados de VIV-1, a porcentagem de espermatozóides vivos foi influenciada significativamente pelo tipo de palheta ($P=0,05$). No Quadro IV verificar que as palhetas de 0,5 ml apresentaram um número significativamente maior ($P<0,05$) de espermatozóides vivos em relação as de 0,25 ml ($53,66\pm 1,48$ vs. $49,97\pm 1,31\%$). À descongelamento da segunda bateria (VIV-2), todavia, não verificou-se influência significativa ($P>0,05$) do tipo de palheta sobre a porcentagem de espermatozóides vivos (tabela I). A palheta de 0,5 ml, pelo seu maior diâmetro e relação superfície/volume, parece ter levado a um menor choque térmico ao

espermatóide. Essa hipótese concorda com os relatos de PICKETT & BERNDTSON (1974), SENGER *et al.* (1983), SENGER (1986) e BARTH (1993).

encontraram menor dano acrossomal para o sêmen caprino em descongelação lenta para a palheta de 0,5 ml. Entretanto menores danos aos espermatozoides são relatados para suínos (MOURA *et al.* 1989) e bovinos (SENGER *et al.*, 1983) quando o sêmen é congelado

TABELA III - Médias e erros-padrão das médias (LSM+se) da taxa de degradação espermática (DEG-%), durante o período de incubação de acordo com o tipo de palheta e a concentração espermática (número de espermatozoides viáveis por dose)

	PALHETA		CONCENTRAÇÃO		
	(ml)		(x10 ⁶)		
	0,25	0,5	50	100	200
DEG	20,72 ^a	6,46 ^a	14,53 ^a	18,99 ^a	7,24 ^a
30min	(6,37)	(5,03)	(6,99)	(6,05)	(7,23)
DEG	47,64 ^a	29,32 ^a	38,41 ^a	46,87 ^a	30,16 ^a
60min	(7,39)	(5,84)	(8,12)	(7,03)	(8,40)
DEG	74,71 ^a	52,75 ^b	69,03 ^a	68,07 ^a	54,09 ^a
90min	(7,10)	(5,61)	(7,81)	(6,75)	(8,07)
DEG	84,99 ^a	70,40 ^b	75,91 ^a	80,76 ^a	75,41 ^a
120min	(5,85)	(4,62)	(6,42)	(5,56)	(6,64)

Valores acompanhados de letras iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan em nível de 5%.

Os níveis de AST não foram influenciados significativamente ($P>0,05$) pelo tipo de palheta (Quadro IV), ao contrário do que ocorreu com as concentrações de ALT. O Quadro IV mostra claramente que o sêmen envasado em mini-palhetas (0,25 ml) apresentou as maiores concentrações de ALT em relação ao envasado em palhetas médias (0,5 ml), diferindo estatisticamente entre si ($P<0,05$). O fato das mini-palhetas apresentarem maiores concentrações de ALT, possivelmente deveu-se a uma maior lesão do espermatozóide caprino envasado em palheta de 0,25ml, já que as mesmas, por serem mais delgadas, são mais vulneráveis ao choque térmico (PICKETT & BERNDTSON 1974; SENGER *et al.* 1983; SENGER 1986; BARTH 1993). Esses resultados concordam com os achados de MÉNDEZ *et al.* (1994) os quais

em mini-palhetas, talvez devido a diferenças inerentes à espécie e/ou processamento.

Concentração espermática

A concentração espermática não influenciou significativamente ($P>0,05$) a MIP-5 (Quadro I), assim como também foi relatado para o sêmen de carneiros (MIES FILHO *et al.*, 1983; EPPELSTON *et al.*, 1994) apesar de alguns autores terem encontrado maior MIP em concentrações inferiores em ovinos ($<200 \times 10^6$ espermatozoides/dose - NEVES *et al.*, 1983) e em bovinos (15×10^6 espermatozoides/dose - SINGH *et al.*, 1993). Maiores diluições não levaram à redução da MIP o que está de acordo com o observado por GERARD & HUMBLLOT (1991) para bovinos e por

TABELA IV - Médias e erros-padrão das médias (LSM+ep) das concentrações de aspartato aminotransferase (AST) e de alanino aminotransferase (ALT) e da porcentagem de espermatozóides vivos (VIV-1), de acordo com o tipo de palheta e a concentração espermática (número de espermatozóides viáveis por dose)

	PALHETA		CONCENTRAÇÃO		
	(ml)		(x10 ⁶)		
	0,25	0,50	50	100	200
AST	24,95 ^a	29,20 ^a	7,93 ^c	24,38 ^b	48,91 ^a
(U/ml)	(3,02)	(2,38)	(3,14)	(3,19)	(3,38)
ALT	5,95 ^a	4,61 ^b	5,69 ^a	5,06 ^a	5,08 ^a
(U/ml)	(0,50)	(0,43)	(0,56)	(0,55)	(0,57)
VIV-1	49,97 ^a	53,66 ^b	53,83 ^a	51,42 ^a	50,19 ^a
(%)	(1,31)	(1,48)	(1,63)	(1,62)	(1,74)

Valores acompanhados de letras iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan em nível de 5%.

MENDEZ *et al.* (1994) em caprinos. No entanto RITAR & BALL (1993) e MAXWELL *et al.* (1995), reportaram maiores motilidades para os espermatozóides ovinos e caprinos diluídos a maiores taxas. Entretanto, para o VIG-5, foi observada influência altamente significativa ($P < 0,01$). Para todos os períodos de incubação, o efeito da concentração espermática sobre o VIG foi significativo ($P < 0,05$), sendo que os valores encontrados para a concentração de 50×10^6 espermatozóides viáveis/dose, em geral foram significativamente inferiores ($P < 0,05$) aos das outras concentrações. Para a dose de 200×10^6 , o VIG se manteve em média superior (tabela II). O fato das concentrações mais elevadas apresentarem maior vigor médio é difícil de ser explicado pois uma redução da quantidade de diluidor na dose inseminante faria com que os espermatozóides se movimentassem mais lentamente devido ao menor espaço disponível. Possivelmente, o que ocorreu foi que ao diluir-se a amostra de sêmen descongelado em citrato de sódio, proporcionalmente à concentração (nenhuma gota para 50×10^6 , uma gota para 100×10^6 e duas gotas para 200×10^6 espermatozóides viáveis/dose de 0,25 ml) a avaliação tivesse sido alterada por uma diluição excessiva da amostra. Praticamente em todas as

avaliações durante o período de incubação, o vigor aumentava proporcionalmente à concentração e também à diluição com citrato.

Como pode ser visto na tabela III, não foi verificada influência significativa ($P > 0,05$) da concentração espermática da dose inseminante sobre a taxa de degradação em nenhuma das avaliações (DEG-30, 60, 90 e 120).

Na análise dos dados de VIV-1 e VIV-2 (tabela IV e I), a porcentagem de espermatozóides vivos não foi influenciada significativamente ($P > 0,05$) pela concentração espermática. Os resultados são distintos aos que foram verificados por SINGH *et al.* (1993) que obtiveram maiores taxas de sobrevivência quando menor número de espermatozóides bovinos foram congelados.

Os níveis de AST foram significativamente ($P < 0,01$) influenciados pela concentração espermática. Todas as concentrações espermáticas diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) quanto aos níveis de AST. A medida que a concentração espermática aumentava, as concentrações de AST se elevavam. A quantidade

de AST no sêmen total está significativamente correlacionada com a concentração espermática (KHOKHAR *et al.*, 1987; SANTOS, 1995) o que pôde ser constatado pelos resultados encontrados também com sêmen diluído/congelado. Quanto maior a quantidade de células na amostra, maior é a quantidade de AST. A variável concentração espermática entretanto não teve efeito significativo ($P>0,05$) sobre os níveis de ALT (tabela IV).

CONCLUSÕES

1. Para o protocolo de congelação aplicado, as mini palhetas de 0,25 ml promovem maiores danos às células espermáticas que as palhetas médias de 0,5 ml. Esses dados sugerem as palhetas de 0,5ml mantiveram com maior eficiência a qualidade do sêmen caprino congelado que as palhetas de 0,25ml;

2. A qualidade do sêmen caprino congelado é mantida apesar da redução da concentração espermática, o que sugere que maior economia e aproveitamento do ejaculado caprino possam ser obtidos com a utilização de 100 ou 50 x 10⁶ espermatozóides viáveis/dose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, H.C. *Fontes de variação da viabilidade e fertilidade do sêmen caprino congelado*. Recife, PE: UFRPE, 1996. 100p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996.
- BARTH, A.D. Factors affecting fertility with artificial insemination. **The Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v.9, n.2, p.275-289, 1993.
- APPLESTON, J.; SALAMON, S; MOORE, N. W. *et al.* The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the of frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.36, n. 3/4, p.211-225, 1994.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamons artificial insemination of sheep and goats**. Australia : Butterworths, 1987. 194 p.
- FATH-EL-BAB, A.Z.; YASSEN, A.M. Effect of freezing method on sperm survival of bull and buffalo bull semen packed in plastic straws. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, Alexandria, v.38, n.3, p.107-116, 1993.
- FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.C.; MIES FILHO, A. *et al.* **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79 p.
- GERARD, O.; HUMBLLOT, P. Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on nonreturn rate estimates of fertility for individual Holstein bulls. **Theriogenology**, New York, v.36, n.5, p.727-736, 1991.
- HARANATH, G.B.; SURYAPRAKASAM, T.B.; RAO, A.V.N. *et al.* Freezability of semen and fertility of frozen semen packaged in mini and medium french straws: A note. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 2., 1988, New Delhi, **Proceedings...** New Delhi, 1988. v. 2, p. 87-88.
- KHOKHAR, B. S.; SINGH, M.; CHAUDHARY, K.C. Transaminases in cattle and buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in relation to fertility and seminal characteristics during moderate and colder seasons. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.13, n.3, p.177-182, 1987.
- LAWRENZ, R. Insemination of Angora and Boer goats with frozen semen. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT, 4., 1987. Brasilia. **Proceedings...** Brasilia : EMBRAPA-DDT, 1987. v.2, p.1503-1504.
- MAXWELL, W.M.C; LANDERS, A.J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. **Theriogenology**, New York, v.43, n.7, p.1201-1210, 1995.
- MÉNDEZ, J.V.; HERRERA, G.G.; GARCÍA, M.E.G. *et al.* Motilidad y daño acrossomal del semen caprino congelado en pajillar de 0,25ml y 0,5ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. **Veterinária México**, Coyoacan, v.25, n.2, p.127-131, 1994.

- MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; SELAIVE-VILLARROEL, A.B. Influência da dose e local de aplicação do sêmen congelado em ovinos. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, a. 2, n.12, p.25-27, 1983.
- MOURA, J.C.A.; WEITZE, K.F.; PEÑA-ALFARO, C.E. *et al.* Influência do método de envasamento/congelamento do sêmen suíno sobre o número de espermatozoides acessórios e taxa de fertilização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 4., 1989, Itapema. *Anais...* Itapema : Universidade Federal da Bahia, 1989. p. 97.
- NAVES, M.; FARANT, A.; BERSON, Y. *et al.* Processing of Creole buck semen in deep frozen form in Guadaloupe. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 6., 1996, Beijing. **Abstracts...** Beijing : International Goat Association, 1996. v.2, p.848.
- NEVES, J.P.; BLAYA, M.C.R.; TEIXEIRA, P.R. Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v.3, n.14, p.11-14, 1983.
- PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.57, n.11, p.1287-1301, 1974.
- RITAR, A.J.; BALL, P.D. Effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability fertility after insemination. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.31, n.3/4, p.249-262, 1993.
- SAHNI, K.L.; MOHAN, G. Effect of various dilution rates on deep-freezing of bovine semen. *Indian Journal of Animal Science*, New Delhi, v.60, n. 7, p.830-832, 1990.
- SANTOS, D.O. *Insulação escrotal em caprinos (Capra hircus, Linnaeus, 1758) adultos e suas consequências nas características escrototesticulares e do sêmen.* Recife, 1995. 82 p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1995.
- SAS Institute Inc. **SAS user's guide : statistics, version 5** edition. Cary, NC, 1990. 956 p.
- SENGER, P.L. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In: MORROW, D. A. *Current therapy in theriogenology.* Philadelphia : W.B. Saunders, 1986. p.116-174.
- SENGER, P.L.; MITCHELL, J.R.; ALMQUIST, J.O. Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25 and .5 ml frenchstraws. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.56, n.6, p.1261-1268, 1983.
- SIMPLÍCIO, A. A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989. Belo Horizonte. **Palestras...** Belo Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989. p.171-177.
- SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O., MACHADO, R., *et al.* Produção de sêmen congelado de caprino de raças exóticas em Sobral, Ceará. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.23, n.3, p.278-280, 1999.
- SINGH, K.T.; MOHANTY, B.N.; RAY, S.K.H. *et al.* Effect of spermatozoa concentration on freezability of bull semen. *Indian Journal of Animal Reproduction*, Madras, v.14, n.2, p.103-104, 1993.
- SMIRNOV, I.V. A theory about deep freezing semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., 1976. **Proceedings...** Krakow, 1976. p.333.
- VARSHNEY, V.P.; SENGUPTA, B.P.; PANDEY, N.D. Enzymatic constituents of goat semen. *Indian Veterinary Journal*, Madras, v.55, n.4, p.348-349, 1978.
- WALLACE, J.M. Artificial insemination and embryo transfer. In: SPEEDY, A.W. **Progress in sheep and goat research.** Wallingford : CAB International, 1992, p.1-24

