

**INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA,
ACROSSOMO E MITOCÔNDRIAS ESPERMÁTICAS EM CAPRINOS SEGUNDO A
CONFORMAÇÃO ESCROTAL**

KAMILLA FIGUEIREDO VIDIGAL

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Clínica Médico-Cirúrgica de Animais de Interesse Econômico.

Teresina-PI
2008

**INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA,
ACROSSOMO E MITOCÔNDRIAS ESPERMÁTICAS EM CAPRINOS SEGUNDO A
CONFORMAÇÃO ESCROTAL**

KAMILLA FIGUEIREDO VIDIGAL
Médica Veterinária

Orientador: Prof. Assoc. Dr. José Adalmir Torres de Souza
Co-orientadora: Profa. Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Clínica Médico-Cirúrgica de Animais de Interesse Econômico.

Teresina – PI
2008

**INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA,
ACROSSOMO E MITOCÔNDRIAS ESPERMÁTICAS EM CAPRINOS SEGUNDO A
CONFORMAÇÃO ESCROTAL**

Kamilla Figueiredo Vidigal

Prof. Assoc. Dr. José Adalmir Torres de Souza
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Piauí
(Orientador)

Prof. Assoc. Dr. Rômulo José Vieira
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Piauí

Profª. Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante
Universidade Federal do Tocantins, Campus de Araguaina
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia

DEDICO

*À minha família, com a qual compartilho todas as
minhas dificuldades e conquistas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que inconfundível na sua infinita bondade, mostrou-me as ferramentas necessárias, e deu-me forças para concluir este trabalho;

*À minha querida mãe, **Maria José Vieira Figueiredo** e ao meu irmão amado **Jorge Antonio Figueiredo Vidigal** pelo amor sincero, pela confiança em mim depositada e pelo apoio incondicional durante a minha caminhada;*

Aos meus familiares, que acreditam no meu progresso e não medem esforços para que eu o alcance;

*Ao meu namorado **Elmo Nascimento Costa**, por compreender minha ausência, pelo apoio emocional e pelo sentimento sublime, sólido e verdadeiro que nos une e nos fortalece nos momentos difíceis;*

*À **Universidade Federal do Piauí**, através da qual tive a oportunidade de subir mais um degrau na minha vida acadêmica;*

*O meu afeto e respeito profundo ao meu orientador Dr. **José Adalmir Torres de Souza**, pelas orientações concedidas, pelas críticas e, finalmente, por acreditar, que apesar das atribulações, seria possível concluir este trabalho;*

*Ao professor **Rômulo José Vieira**, pela amizade e incentivo;*

*À Dra. **Tânia Vasconcelos Cavalcante**, pela competência e seriedade com que me coorientou neste trabalho;*

*À **Antonio de Sousa Júnior** e **Maurício Barbosa Salviano**, pela amizade, apoio e colaboração;*

*Ao professor **João Batista** pelo auxílio na avaliação estatística;*

*Os meus sinceros agradecimentos ao Sr. **Zé da Burra** e **Narcisio**, pelo auxílio no manejo com os animais, que foi de fundamental importância, para a realização deste*

trabalho, e aos demais funcionários da UFPI, pela acolhida, apoio, e pelas amizades construídas;

*Aos amigos de república **Fernanda Tércia Silva Cardoso, Caroline Moura Marques, Felipe de Jesus Moraes Júnior e Fabrício Brito Silva**, pela amizade, apoio e mesmo pelos momentos difíceis gerados pela convivência diária, mas que de alguma forma serviram para meu crescimento pessoal. Deixo registrado meu respeito e gratidão;*

Aos colegas de Pós-graduação, pela convivência agradável, pelo companheirismo e pelos momentos de lazer;

À CAPES, pela concessão de bolsa;

Finalmente, a todos aqueles que fizeram parte da minha história, mas que por motivos diversos não podem mais compartilhar do meu convívio e aos que permanecem ao meu lado, os meus sinceros agradecimentos.

*“São fúteis e cheias de erros as ciências que não
nasceram da experimentação, mãe de todo o
conhecimento.”*

(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3. CAPÍTULO I.....	30
3.1 Resumo.....	31
3.2 Introdução.....	32
3.3 Material e Métodos.....	36
3.4 Resultados e Discussão.....	42
3.5 Conclusão.....	58
3.6 Referências Bibliográficas.....	59
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
APÊNDICES.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios padrões para volume, motilidade, vigor, turbilhão, concentração, defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária e defeitos de cauda, de espermatozóides caprinos, sem e com divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008.....	43
Tabela 2. Médias e desvios padrões para a motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento de espermatozóides caprinos, sem e com divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008.....	45
Tabela 3. Médias e desvios padrões para a integridade da membrana plasmática (sondas fluorescentes) de espermatozóides caprinos, sem e com divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008.....	47
Tabela 4. Médias e desvios padrões para a integridade da membrana plasmática (HOST) de espermatozóides caprinos, sem e com divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008.....	49
Tabela 5. Médias e desvios padrões para a integridade do acrossomo espermático de caprinos, sem e com divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008.....	52
Tabela 6. Médias e desvios padrões para o número de espermatozóides e índice de atividade citoquímica, por classes, avaliadas no sêmen de caprinos, sem e com divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008.....	54
Tabela 7. Coeficientes de correlação entre a motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento e testes especializados para avaliação do sêmen de caprinos sem e com divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008.....	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema demonstrando os domínios da membrana plasmática do espermatozóide (Adaptado de FLESH e GADELLA, 2000)..... 20
- Figura 2.** Classificação para integridade da membrana plasmática: **Categoria 1-** espermatozóide com todas as membranas plasmáticas íntegras; **Categoria 2-** espermatozóides com membranas plasmáticas e acrossomais danificadas e membranas mitocondriais íntegras; **Categoria 3-** espermatozóides com membranas acrossomais e mitocondriais íntegras e membranas plasmáticas danificadas; **Categoria 4-** espermatozóides com membranas acrossomais e plasmáticas íntegras e membranas mitocondriais danificadas; **Categoria 5-** espermatozóides com membranas acrossomais, plasmáticas e mitocondriais danificadas (HARRISON e VICKERS, 1990)..... 22
- Figura 3.** Efeito do teste hiposmótico: **A-** espermatozóide sem reação (anormal); **B a M-** vários graus de reação nas caudas dos espermatozóides (normais) (FONSECA et al., 2005)..... 23
- Figura 4.** Classificação para integridade do acrossomo: **Categoria 1-** espermatozóides não capacitados; **Categoria 2-** espermatozóides capacitados; **Categoria 3-** espermatozóides mortos (ASSUMPCÃO et al., 2007)..... 25
- Figura 5.** Classificação para atividade mitocondrial: **Classe 1-** quase todas as mitocôndrias são ativas; **Classe 2-** segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos; **Classe 3-** menos da metade da bainha mitocondrial ativa com poucas mitocôndrias dispersas; **Classe 4-** espermatozóides completamente inativos (HRUDKA, 1987)..... 27

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Região escrotal de caprinos dos diferentes grupos: **G1-** animais sem divisão externa do escroto; **G2-** animais com divisão externa do escroto..... 37
- Figura 2.** Espermatozóides caprinos corados com DIC e PI: 1- membranas íntegras; 2- membranas parcialmente danificadas; 3- membranas danificadas..... 46
- Figura 3.** Espermatozóides caprinos submetidos ao HOST: **1-** espermatozóide com membrana plasmática danificada; **2-** espermatozóide com membrana plasmática íntegra..... 49

- Figura 4.** Espermatozóides caprinos corados com DIC e PI: **1-** acrossomo íntegro; **2-** acrossomo danificado; **3-** espermatozóides mortos..... 51
- Figura 5.** Espermatozóides caprinos corados com DAB: **1-** quase todas as mitocôndrias ativas; **2-** mitocôndrias ativas e inativas com predominância das ativas; **3-** menos da metade das mitocôndrias ativas; **4-** nenhuma mitocôndria ativa..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HOST= Hipoosmotic Swelling Test (teste hiposmótico)

DIC= Diacetato de Carboxifluoresceína

PI= Iodeto de Propídio

DAB= Diaminobenzidine

SRD= sem raça definida

G1= grupo 1

G2= grupo dois

°C= graus Celsius

mL= mililitro

%= porcentagem

MP= membrana plasmática

DNA= ácido desoxirribonucleico

ATP= Adenosina Tri-fosfato

CBRA= Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

μL= microlitro

pH= potencial de hidrogênio

M= molar

mg= miligrama

IAC= índice de atividade citoquímica

p= probabilidade

mOsm= miliosmol

sptz= espermatozóide

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da conformação escrotal de caprinos sobre a integridade e funcionalidade da membrana plasmática, do acrossomo e das mitocôndrias espermáticas, além da correlação entre estes testes, e destes com a motilidade e vigor espermáticos. Para tanto, foram utilizados sete reprodutores entre 12 e 24 meses de idade, divididos em dois grupos. O Grupo 1 (n=4), animais sem divisão externa do escroto e o Grupo 2 (n=3), com divisão externa do escroto. O sêmen foi colhido com auxílio de vagina artificial (seis colheitas por animal), avaliado macro e microscopicamente, e, em seguida, criopreservado. Após descongelamento, realizou-se os testes específicos para avaliar a integridade e funcionalidade da membrana plasmática, do acrossomo e das mitocôndrias espermáticas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ao nível de 1% para comparação das médias que foram correlacionadas através do Coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados obtidos mostraram que a conformação escrotal influenciou na qualidade espermática referente às patologias, onde o grupo 1 expressou percentual de defeitos de cauda superior ao grupo 2. Para o parâmetro vigor, pós-descongelamento, o grupo 2 mostrou-se superior ao grupo 1. A conformação escrotal não influenciou na integridade e funcionalidade da membrana, do acrossomo e das mitocôndrias. Foram observadas correlações positivas entre o vigor e a motilidade espermática pós-descongelamento, entre espermatozoides com membranas íntegras através do HOST e através do teste com sondas fluorescentes, e entre a integridade do acrossomo e da membrana plasmática. Já a atividade mitocondrial e a integridade de membrana foram correlacionadas negativamente. Não houve correlação entre integridade das membranas plasmáticas, para ambos os testes (sondas fluorescentes ou HOST), com a motilidade espermática, assim como entre atividade mitocondrial e motilidade espermática. Conclui-se que, sob as condições experimentais utilizadas neste trabalho, a conformação escrotal não influenciou na qualidade espermática, a exceção das patologias de cauda, pós-colheita; e do vigor, pós-descongelamento. A associação de testes clássicos e específicos na avaliação do sêmen, pode, com mais eficiência, prever a capacidade fertilizante de um ejaculado.

Palavras-chave: caprino; conformação escrotal; qualidade espermática

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of the goat's scrotal conformation on the integrity and functionality of the plasmatic membrane, on the acrossome and spermatic mitochondrias, and the correlation among these tests and of these with the spermatic motility and vigour. Seven sires with 12 to 24 months old were used. They were divided into two groups, being the group 1 with four animals with no division on the external scrotum and group 2 with three animals with scrotal division. After coleted with vagina artificial, the semen was macro and microscopically evaluated and frozed. After thawed the especifics tests to evaluate the integrity and functionality of the plasmatic membrane, of the acrossome and spermatic mitocondry were carried. The data were analysed by the analyses of variancy (ANOVA) and the means were compared by the Tukey test, 1%. The correlation analyses were taken using the Pearson's coefficient. Regarding the pathology, the scrotal shape affected the spermatic quality since the group 1 had more tail problems than the group 2. The after tawed vigour was higher in the group 2 than in the group 1. The scrotal shape had no effect on the membrane, acrossome and mitocondry integrity and functionality. Positive correlations were observed between vigour and after thawed spermatic motility, between sperm with integer membrane by the HOST and by the fluorescents probes and between the acrossomic and plasmatic membrane integrity. However, the mitochondrial activity and the membrane integrity were negatively correlated. There was no correlation between the integrity of the plasmatic membrane and the spermatic motility, nor between the mitochondrial activity and the spermatic motility. According to these fings the scrotal shape had no effect on the spermatic quality, except for tail defect after colleted and vigor post-thawed. The tests are complementary and together they predict, with more effiience, the ejaculate's fertilizing capacity.

Key words: goats; scrotal shape; spermatic quality

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura representa uma das principais atividades econômicas nas áreas mais secas do Nordeste brasileiro, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento regional. A carne e o leite desses animais são as principais fontes de proteína animal para as populações de baixa renda, notadamente no semi-árido nordestino, onde a venda de carne e peles representa um fator importante, visto que constitui uma atividade geradora de recursos e conseqüentemente contribuem para o desenvolvimento regional. Entretanto, esta atividade revela-se com reduzida produtividade em decorrência de um baixo desempenho reprodutivo, alta incidência de problemas sanitários e fatores climáticos traduzidos por reduzida quantidade e qualidade de alimentos em determinadas épocas do ano.

Segundo Santos et al. (1998) o desempenho reprodutivo dos pequenos ruminantes domésticos é influenciado pela adaptação deles ao meio ambiente em que são explorados. A conformação escrotal e a temperatura ambiente exercem considerável influência sobre a temperatura testicular (MACHADO JÚNIOR, 2005), que por sua vez, é fator preponderante para a espermatogênese, sendo necessário uma temperatura cerca de 2 a 6° C inferior à temperatura do abdome (KASTELIC et al., 1996). A divisão externa do escroto observada em caprinos criados em regiões áridas e semi-áridas do Leste da África (ROBERTSHAW, 1982) e em caprinos criados na Região Nordeste do Brasil (NUNES et al., 1983) consiste em importante adaptação desses animais às condições edafoclimáticas em que vivem.

Os resultados de vários estudos têm demonstrado que esses animais podem representar potencial reprodutivo superior àqueles que não apresentam tal característica (NUNES et al, 1983; SILVA e NUNES, 1988; CEZAR et al., 2002; ALMEIDA, 2003; AZEVEDO, 2005; NUNES, 2005; MACHADO JÚNIOR, 2005, SALVIANO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Avaliação clássica do sêmen

O objetivo da avaliação seminal é conhecer o número de células estrutural e funcionalmente normais relacionado com a capacidade fecundante do sêmen (PEÑA, 1997). Entretanto, nenhum teste, isoladamente, é capaz de prever a fertilidade de um ejaculado, mas a combinação de vários testes pode ser utilizada para selecionar ejaculados com maior potencial de fertilidade (HAFEZ e HAFEZ, 2003). Deste modo, têm-se buscado identificar animais capazes de produzir ejaculados com um maior número de espermatozoides morfológicamente normais, dotados de motilidade progressiva e aptos a executar a fertilização (GARCIA, 2006).

Rotineiramente, a análise para predição da fertilidade do sêmen baseia-se na avaliação da motilidade, vigor, concentração e patologias espermáticas, com o intuito de se obter informações sobre o estado da espermatogênese e do potencial de fertilização do espermatozoide. Estes testes são, frequentemente, insuficientes e não podem avaliar a real habilidade de fertilização (CORREA et al., 1997; MELO et al., 2005).

A avaliação macroscópica do sêmen permite observar algumas características que, em conjunto com aquelas observadas ao microscópio, são de relevante importância na análise dos parâmetros seminais para o processamento do mesmo. Dentre as características macroscópicas comumente utilizadas na avaliação do sêmen estão o volume, a coloração e o aspecto. O volume de sêmen ejaculado pode variar de acordo com a espécie, raça, idade, clima e frequência de colheita, sendo aceitável uma variação entre 0,2 e 2,0 mL (MIES FILHO, 1987). A coloração deve ser amarelada ou esbranquiçada (CBRA, 1998) e constitui-se em importante parâmetro na determinação diagnóstica de algumas patologias do aparelho reprodutor, haja vista que alterações desta característica correspondem à presença de elementos estranhos como sangue, pús e urina que, por sua vez, afetam a viabilidade dos espermatozoides (SORRIBAS, 1995). O sêmen deve apresentar aspecto variando de leitoso a cremoso, estando relacionado à concentração espermática (CBRA, 1998).

A análise microscópica do sêmen inclui, basicamente, os parâmetros turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. O turbilhonamento relaciona-se à motilidade, vigor e concentração espermática. Este

parâmetro é classificado em uma escala de 0 a 5, sendo aceitáveis valores médios de 3 (CBRA, 1998). Os parâmetros motilidade e vigor espermáticos devem ser mensurados simultaneamente (SEAGER e FLETCHER, 1972). A motilidade consiste na percentagem de espermatozóides com movimentos progressivos na amostra, sendo aceitável motilidade mínima de 80% (CBRA, 1998). A avaliação da motilidade pode ser realizada de forma subjetiva, utilizando microscópio ou, de forma mais acurada, através de programas de computação (SOUZA, 2003; SILVA et al., 2003). O vigor espermático refere-se à qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides sendo classificado obedecendo uma escala de 0 a 5, onde o mínimo aceitável é 3 (SILVA et al., 2003). A concentração espermática corresponde ao número de espermatozóides por mililitro de sêmen e pode ser determinada através da contagem celular em câmara de Neubauer ou a partir da espectrofotometria (CARDOSO e SILVA, 1997), de modo que o valor normal está em torno de 3 bilhões por mililitro (CBRA, 1998). A morfologia espermática determina a percentagem de espermatozóides patológicos dentro da população, não devendo ultrapassar os 10%, nos pequenos ruminantes, principalmente para utilização em inseminação artificial (CBRA, 1998)), visto que espermatozóides mortos e anormais apresentam efeitos adversos sobre a fertilidade potencial do sêmen (MAXWELL e WATSON, 1996).

Durante a avaliação dos ejaculados, é necessário considerar indicadores mais específicos da condição espermática. Técnicas que indiquem alterações de morfofuncionalidade nos compartimentos celulares e/ou organelas devem auxiliar sobremaneira a identificação e seleção de grupos de gametas mais aptos a executar os eventos imprescindíveis à fecundação (GARCIA, 2006).

2.2 Avaliação estrutural e funcional dos espermatozóides

O espermatozóide é uma célula alongada (GARNER e HAFEZ, 2004), formada por duas regiões altamente especializadas: a cabeça, na qual está contido o DNA, pequena quantidade de citoplasma e o acrossomo, uma vesícula contendo enzimas hidrolíticas, vital para a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida; e o flagelo, envolvido com a motilidade da célula; neste segmento encontra-se a peça intermediária, contendo as mitocôndrias, relacionadas com a produção de energia (YANAGIMACHI, 1994).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre (fertilização), produzindo o zigoto (EDDY e O'BRIEN, 1994).

2.3.1 Membrana plasmática

Todas as células (procariontes ou eucariontes) são circundadas por uma membrana plasmática (MP) que define a sua delimitação, separando seu conteúdo do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, a MP determina a composição do citoplasma celular (COOPER, 1996), e tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (SINGER e NICOLSON, 1972).

O modelo básico das membranas biológicas segue a organização estrutural de bicamada de lipídios com proteínas associadas (GENNIS, 1989; COOPER, 1996). Os principais lipídios presentes nesta estrutura celular são fosfolipídios (colina, serina, glicerol e inositol), glicolipídios e colesterol. Os fosfolipídios são constituintes de 50% da massa das membranas plasmáticas, sendo responsáveis por cerca de 60 a 70% dos lipídios totais de um ejaculado (WATSON, 1981). Os glicolipídios são encontrados exclusivamente no folheto externo da membrana plasmática, constituindo cerca de 2% dos lipídios totais da membrana (COOPER, 1996). O colesterol, entretanto, está presente em grande quantidade na membrana, equivalendo-se às mesmas quantidades molares que os fosfolipídios (COOPER, 1996). A quantidade de colesterol encontrada na membrana espermática varia entre seus domínios, entre as espécies animais e entre indivíduos da mesma espécie (GENNIS, 1989; AMANN e GRAHAM, 1993; HOLT, 1995; CROSS, 1998). O colesterol tem importante papel na regulação da estabilidade e da permeabilidade da MP (YAGLE, 1985), sendo que o efluxo de colesterol da MP dos espermatozoides é o primeiro passo para o início do processo de capacitação (SEKI et al., 1992).

Enquanto os fosfolipídios são os elementos estruturais fundamentais das membranas, as proteínas são responsáveis por intermediar e realizar suas funções específicas (COOPER, 1996). Embora grande parte das proteínas estejam envolvidas no acondicionamento de DNA, outras estão envolvidas com enzimas do acrossoma,

receptores da MP, elementos de funcionalidade da membrana (transporte de íons e carboidratos) e estruturas do citoesqueleto (AMANN e GRAHAM, 1993). As proteínas podem ser distinguidas em duas classes: proteínas periféricas e integrais à membrana. As proteínas periféricas encontram-se indiretamente associadas com as membranas através de interações protéicas envolvendo ligações iônicas que se desfazem frente a altas concentrações de sais. Já as proteínas integrais somente podem ser liberadas por tratamentos que rompam a bicamada de fosfolípidios (SINGER e NICOLSON, 1972).

A porção extracelular das proteínas da MP são recobertas por carboidratos que estão presentes na superfície celular, sendo, esta estrutura, conhecida como glicocálice, a qual tem a função de proteger a superfície celular, além de servir de marcadores para uma grande variedade de interações celulares (COOPER, 1996).

As membranas espermáticas seguem o modelo clássico de membrana plasmática (WATSON, 1981; WATSON, 1995). Entretanto, a membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos apresenta-se organizada em domínios regionais bem delineados que diferem em composição e função (WOLFE et al., 1998).

Na cabeça do espermatozoide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial, sendo que os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. No flagelo, observa-se o domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e o domínio da cauda posterior, que cobre as peças principal e terminal da cauda (EDDY e O'BRIEN, 1994) (Figura 1).

A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide é separada da membrana plasmática da peça intermediária pelo anel posterior, e a membrana da peça intermediária é separada da membrana do flagelo pelo anel anular. Estes diferentes domínios contêm variadas concentrações e distribuições de partículas intramembranas (FLESCHE e GADELLA, 2000).

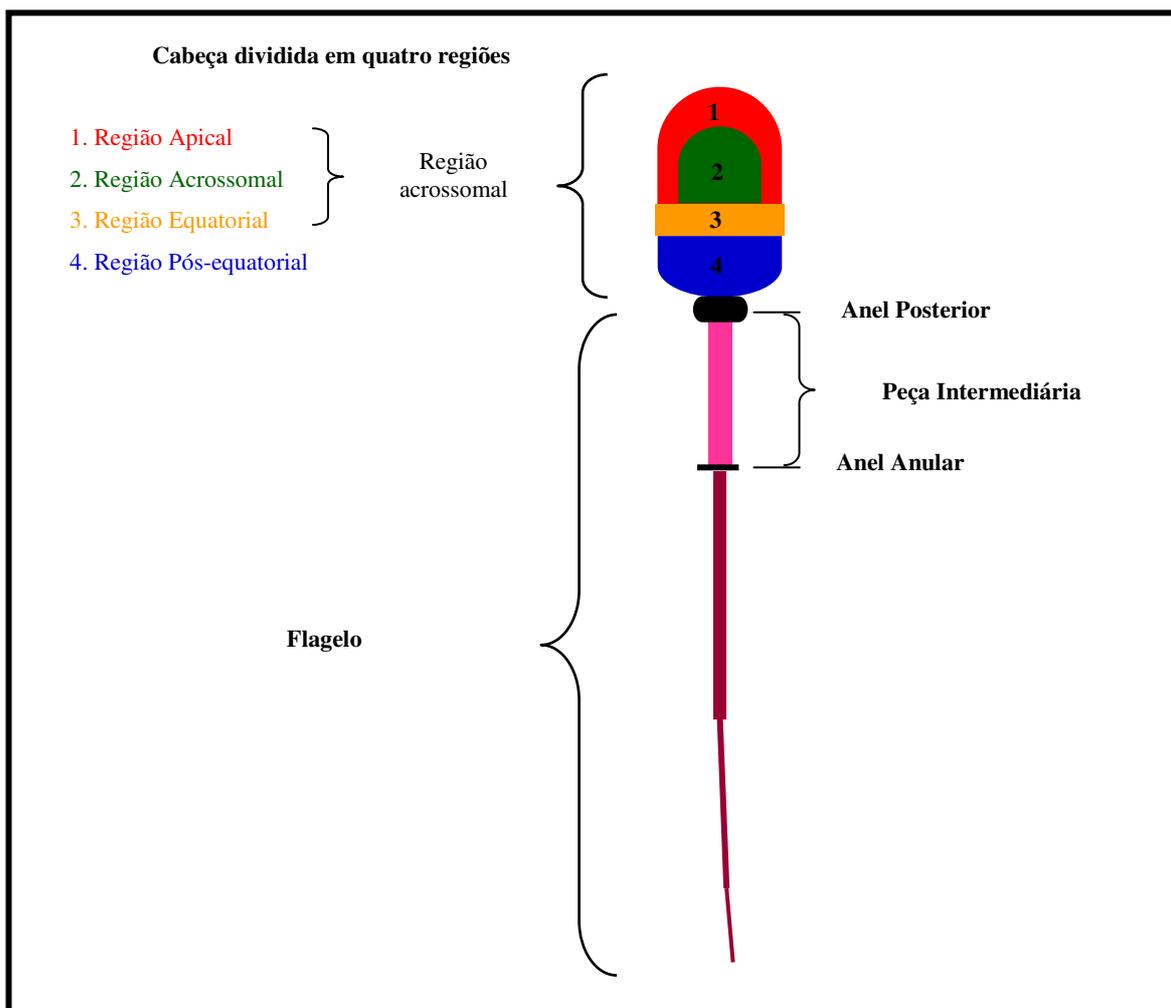


Figura 1. Esquema demonstrando os domínios da membrana plasmática do espermatozóide (Adaptado de FLESH e GADELLA, 2000).

A diferenciação regional com seus domínios específicos, que compõem a superfície espermática, é correlata com funções especializadas. Assim, moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes no acrossomo anterior, moléculas envolvidas na fusão do espermatozóide com o oócito estão presentes no acrossomo posterior e moléculas envolvidas na atividade flagelar estão associadas com a membrana plasmática do flagelo (ÕURA e TOSHIMORI, 1990; EDDY e O'BRIEN, 1994).

A membrana plasmática representa importante papel na capacidade fertilizante destas células, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (HOLT, 1995; WATSON, 1995; LENZI

et al., 1996). Portanto, esta estrutura deve apresentar-se íntegra física e funcionalmente para que a célula tenha viabilidade e capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAN, 1992; KUMI-DIAKA, 1993). Para avaliar tal integridade alguns testes laboratoriais podem ser realizados, dentre eles a avaliação a partir da utilização de sondas fluorescentes e o teste hiposmótico.

A técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células, detectar integridade estrutural de forma clara (CELEGHINI, 2005), além de possibilitar a avaliação de vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2007).

Segundo Garner et al. (1986) a combinação do Iodeto de Propídio (PI) com Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) permite avaliar a integridade da membrana plasmática devido às suas características moleculares, sendo proposto por esses autores o mecanismo de ação desses corantes fluorescentes, de modo que o DIC, por conter radicais acetil, consegue transpor a membrana intacta, sendo imediatamente desacetilada por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável e fazendo com que as células íntegras corem-se em verde. Em contrapartida, o PI somente penetra através de células que contenham membrana plasmática lesada, tendo afinidade pelo DNA e corando o núcleo da célula em vermelho (GRAHAM et al., 1990; ARRUDA e CELEGHINI, 2003), bem como a peça intermediária por conter DNA (Figura 2).

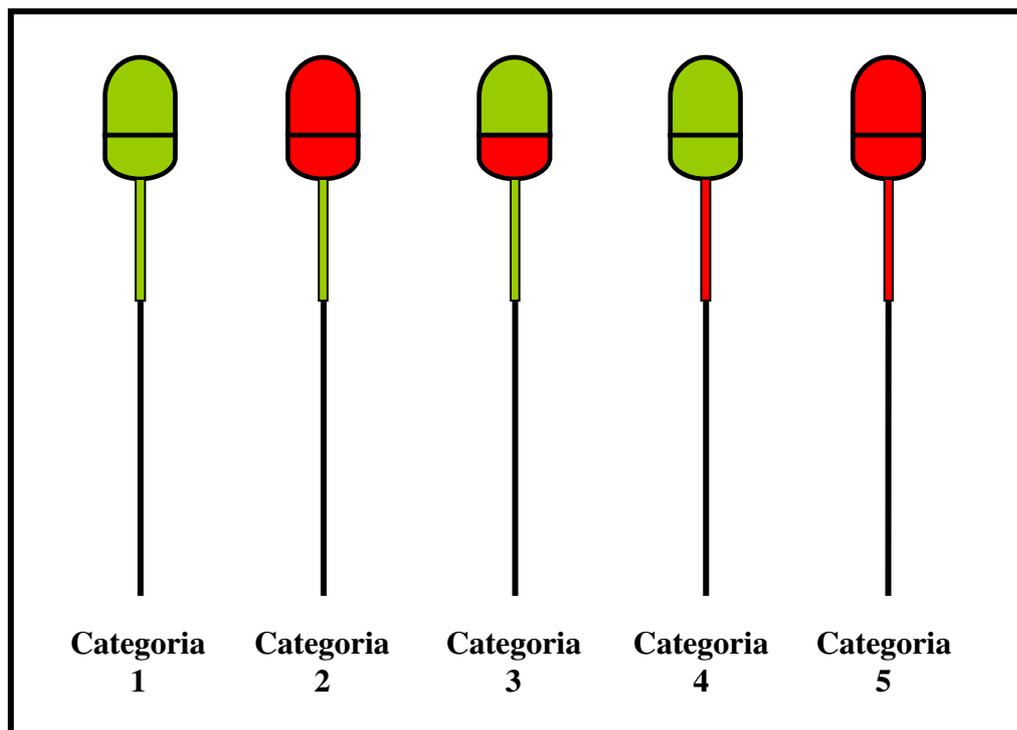


Figura 2. Classificação para integridade da membrana plasmática: **Categoria 1-** espermatozóide com todas as membranas plasmáticas íntegras; **Categoria 2-** espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomais danificadas e membranas mitocondriais íntegras; **Categoria 3-** espermatozoides com membranas acrossomais e mitocondriais íntegras e membranas plasmáticas danificadas; **Categoria 4-** espermatozoides com membranas acrossomais e plasmáticas íntegras e membranas mitocondriais danificadas; **Categoria 5-** espermatozoides com membranas acrossomais, plasmáticas e mitocondriais danificadas (HARRISON e VICKERS, 1990).

Adaptações às técnicas de coloração com sondas fluorescentes foram propostas por Harrison e Vickers (1990), facilitando a visualização dos espermatozoides em microscópio de epifluorescência e o aumento da aplicabilidade da técnica a partir da adição de concentrações baixas de formaldeído para imobilização dos espermatozoides, durante a avaliação.

O teste hiposmótico (HOST) consiste na exposição do espermatozóide a uma solução de baixa osmolaridade de modo que haja passagem de água através da membrana espermática, numa tentativa de atingir um equilíbrio osmótico entre os compartimentos intra e extracelular. Este influxo de água aumenta o volume da célula e provoca a dilatação da membrana plasmática. A cauda é particularmente susceptível a esta condição, torcendo-se em forma helicoidal (Figura 3). Esta situação é facilmente observada com um microscópio de contraste de fase, sendo suficiente contar 100

espermatozoides para validar o teste (JEYENDRAN et al., 1984; ARTIGA, 1994; ROTA et al., 2000). Esta reação é um sinal de que o transporte de água através da membrana ocorreu normalmente, ou seja, a membrana está íntegra e funcionalmente ativa (JEYENDRAN et al., 1984, CORREA e ZAVOS, 1994).

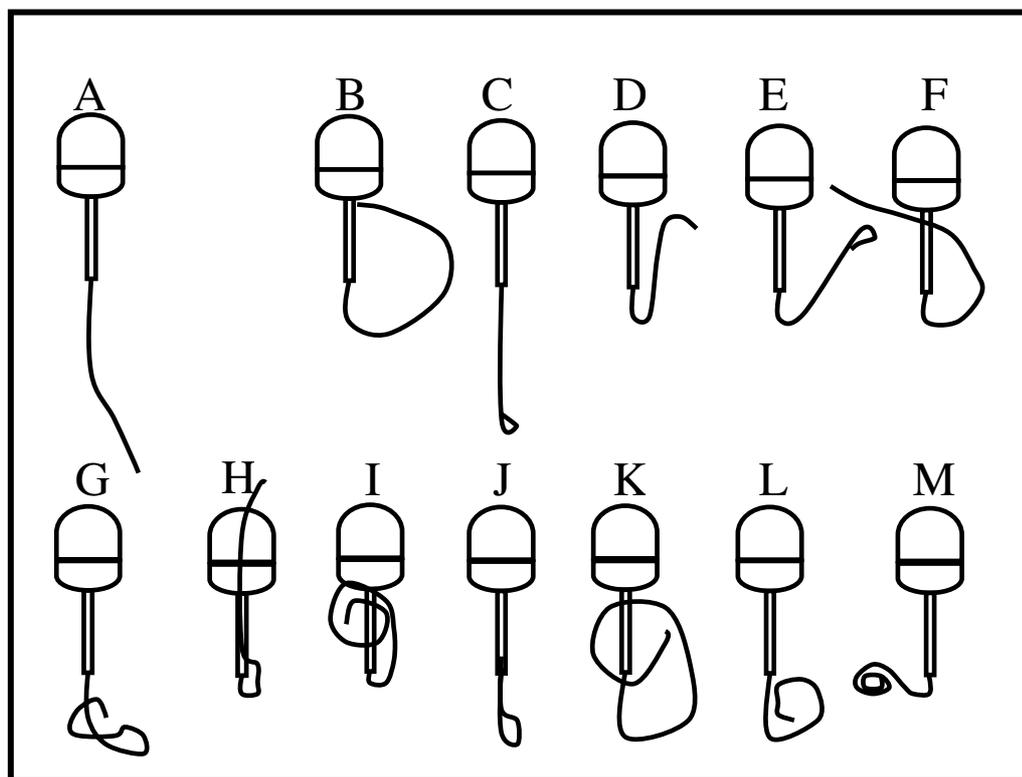


Figura 3. Efeito do teste hiposmótico: **A-** espermatozóide sem reação (anormal); **B a M-** vários graus de reação nas caudas dos espermatozoides (normais) (FONSECA et al., 2005).

2.3.2 Acrossomo

O acrossomo é uma estrutura de dupla parede, situada na cabeça do espermatozóide, entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo (GARNER e HAFEZ, 2004), formado, sobretudo, a partir do complexo de Golgi. Nele estão contidas as enzimas acrossomais, que são liberadas durante a reação acrossômica, um evento essencial para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito.

Portanto, a integridade do acrossomo, bem como a manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização (SILVA e GADELLA, 2006). De acordo com esses autores, reações acrossomais prematuras levam à espermatozóides inférteis e, por isso, a avaliação da integridade acrossomal antes dos processos de reprodução assistida vem sendo cada vez mais empregada.

Estudos realizados por Chan et al. (1996), mostram que a integridade da membrana acrossomal pode estar relacionada com a integridade de outras membranas e também com a motilidade celular. Por esse motivo, houve o interesse de se estudar marcadores fluorescentes de acrossomo combinados a marcadores de membrana, como o Iodeto de Propídio (PI).

Whitfield e Parkinson (1995), investigando a correlação entre a fertilidade de touros à campo e testes *in vitro* de indução da reação acrossômica, concluíram que o uso de sondas fluorescentes de Iodeto de Propídio e Diacetato de Carboxifluoresceína poderia ser utilizado na avaliação da reação acrossômica. Tal método de coloração tem sido amplamente utilizado na avaliação da integridade do acrossomo após a criopreservação de espermatozóides em diferentes espécies (MEDINA, 1995; ZÚCCARI, 1998).

Assumpção et al. (2002) observaram maior eficiência da técnica de epifluorescência com Iodeto de Propídio e Diacetato de Carboxifluoresceína em comparação à coloração tripla com vermelho congo, vermelho neutro e giemsa para detectar espermatozóides capacitados. Estes autores relacionaram a classificação proposta por Harrison e Vickers (1990) à capacitação espermática (Figura 4).

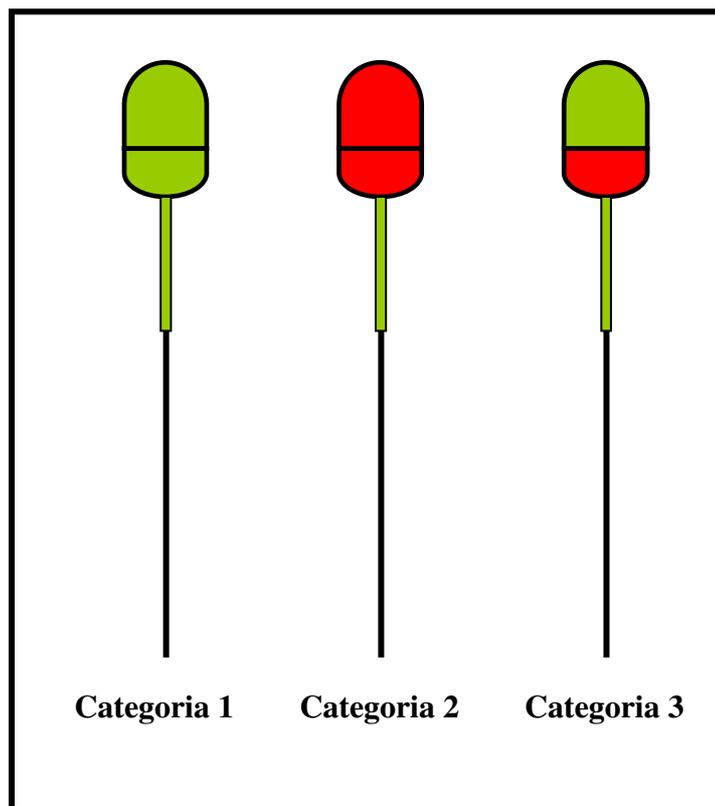


Figura 4. Classificação para integridade do acrossomo (ASSUMPÇÃO et al., 2002): **Categoria 1-** espermatozoides não capacitados; **Categoria 2-** espermatozoides capacitados; **Categoria 3-** espermatozoides mortos (ASSUMPÇÃO et al., 2002).

2.3.3 Mitocôndrias

A mitocôndria é uma organela presente em todos os tipos celulares que geralmente apresenta-se em formato esférico, ainda que existam alterações sutis de forma. Em virtude de sua atividade, está localizada nas regiões celulares onde a demanda energética é maior. Em alguns tipos celulares estão dispostas em locais fixos, como no caso dos espermatozoides, em que estão presentes na peça intermediária de forma helicoidal (ALBERTS et al., 1999).

As mitocôndrias são as principais células produtoras de energia oxidativa através da produção de ATP via cadeia de transporte de elétrons (CONNELL et al., 2002) ou via glicólise (SILVA e GADELLA, 2006). O ATP é o suplemento energético para os batimentos flagelares, a hiper-ativação e a penetração do espermatozoide no oócito.

Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (PAPAIIOANNOU et al., 1997, CONNELL et al., 2002).

Em humanos, há inúmeras evidências da correlação entre baixa função mitocondrial espermática, diminuição de motilidade e redução de fertilidade (GRAHAM, 2001; MARCHETTI et al., 2004). Entretanto, a importância da mitocôndria na motilidade espermática foi, recentemente, reconsiderada, uma vez que a bainha fibrosa da cauda contém enzimas envolvidas na glicólise, cuja retirada, em espermatozóides de ratos, deixou-os imóveis, enquanto que espermatozóides submetidos a drogas que interferem na fosforilação oxidativa, continuaram móveis e vivos. Contudo, as mitocôndrias provavelmente geram o ATP para a peça intermediária e cabeça do espermatozóide, necessário na manutenção das membranas (SILVA e GADELLA, 2006).

O comprimento da peça intermediária dos espermatozóides tem sido considerado indicador biológico, que pode ser usado como preditor de fertilidade em bovinos (LUKEFAHR e HOHENBOKEN, 1981), sendo possível que um aumento no seu comprimento possa estar associado a uma maior taxa de fosforilação oxidativa, e assim com maior atividade metabólica influenciando na motilidade ou vitalidade da célula, já que as mitocôndrias são transformadoras de energia para a célula (EDDY, 1988).

A atividade mitocondrial pode ser determinada a partir da aplicação de uma técnica desenvolvida por Hrudka (1987). Esta técnica é baseada na oxidação do 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e depósito do mesmo na bainha mitocondrial ao longo da peça intermediária dos espermatozóides, de modo que quanto maior a atividade mitocondrial na peça intermediária maior será a deposição do corante sobre a mesma, sendo esta reação observada em microscópio de contraste de fase (Figura 5).

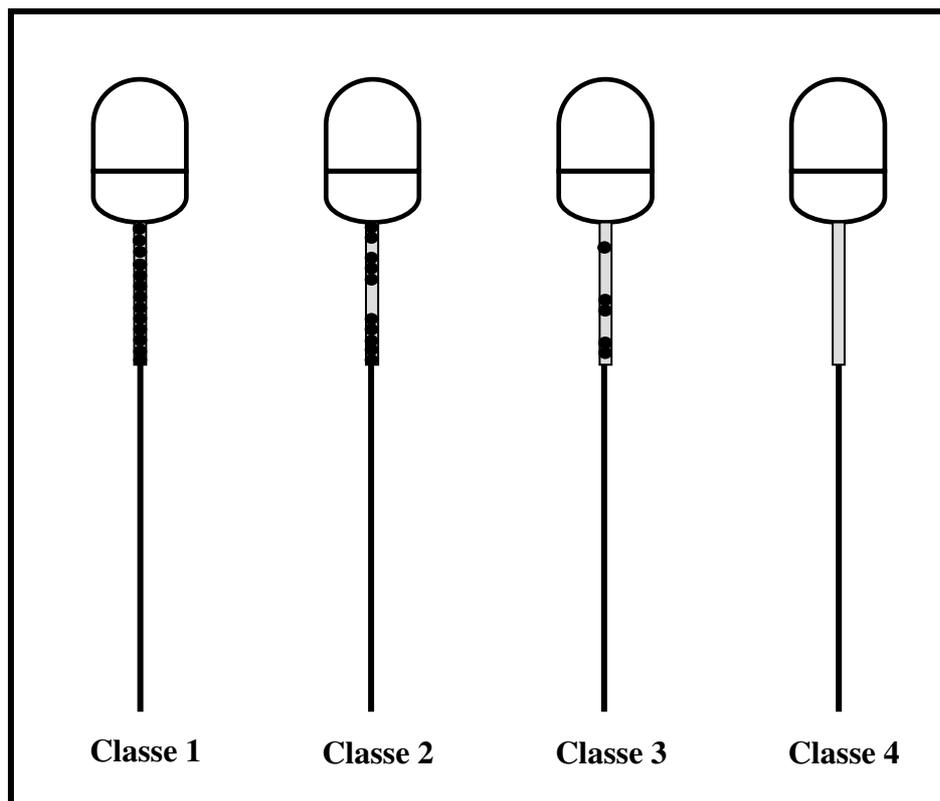


Figura 5. Classificação para atividade mitocondrial: **Classe 1-** quase todas as mitocôndrias são ativas; **Classe 2-** segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos; **Classe 3-** menos da metade da bainha mitocondrial ativa com poucas mitocôndrias dispersas; **Classe 4-** espermatozoides completamente inativos (HRUDKA, 1987).

2.3 Influência da conformação escrotal sobre os parâmetros reprodutivos

Em regiões áridas e semi-áridas do Leste da África, são encontrados caprinos que apresentam uma divisão no escroto (ROBERTSHAW, 1982). Esta característica foi observada, com grande frequência, em caprinos criados na Região Nordeste do Brasil, sendo denominada por Nunes et al. (1983) como “bolsa escrotal bipartida”. Animais que apresentam essa característica possuem um aumento nos parâmetros biométricos do testículo, na qualidade seminal e na eficiência reprodutiva em relação aos que não a possuem, uma vez que, esta condição amplia consideravelmente a superfície de cada testículo expondo-o à temperatura ambiente e propiciando melhor dissipação de calor (NUNES et al, 1983; SILVA e NUNES, 1988; CEZAR et al., 2002; ALMEIDA, 2003; AZEVEDO, 2005; MACHADO JÚNIOR, 2005, SALVIANO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Nunes et al. (1983) e Silva e Nunes (1988) avaliaram a influência da morfologia escrotal sobre as características do sêmen e seu efeito sobre a fertilidade de caprinos da raça Moxotó e constataram que o sêmen dos reprodutores com escroto bipartido apresentava melhor qualidade quando comparado com o de reprodutores com escroto não bipartido quando submetido ao teste de termorresistência.

Cezar et al. (2002) encontraram maior concentração espermática no ejaculado de animais com divisão escrotal.

Almeida (2003) apontou, em seu estudo, que animais com menor grau de divisão escrotal apresentavam maior percentual de defeitos espermáticos, e Azevedo et al. (2005), por sua vez, acrescentaram que animais com maior grau de divisão escrotal apresentavam melhores valores de motilidade massal, vigor, motilidade individual e concentração espermática.

Nunes (2005) revelou a maior extensão da artéria testicular em animais que apresentam divisão externa do escroto, o que possibilita maior exposição do sangue arterial quente com o sangue venoso mais frio (mecanismo de contra-corrente) e, conseqüente diminuição da temperatura do sangue que chega ao testículo.

Ainda segundo os estudos de Nunes (2005), caprinos com divisão externa do escroto apresentam a pele escrotal constituída por camadas mais delgadas com maior quantidade de glândulas sudoríparas o que favorece a perda de calor. Fato este, já observado por Lima Júnior e Vianni (1995) que relataram haver diferença entre as temperaturas testiculares de caprinos com e sem divisão do escroto, sendo que as menores temperaturas foram aferidas em caprinos com divisão escrotal.

Machado Júnior (2005) evidenciou menores médias de temperatura do escroto e testículo em animais com maior grau de divisão escrotal, associando a esta característica um melhor mecanismo de termorregulação escroto-testicular e, conseqüentemente, melhor qualidade de sêmen.

Salviano et al. (2006) concluíram, em seu trabalho, não haver influência da conformação escrotal de caprinos sobre a integridade do DNA, apesar das concentrações de testosterona ter sido superior ($p < 0,05$) nos animais com divisão externa de escroto.

Silva et al. (2008) avaliaram a influência da conformação escrotal sobre a proporção de espermatozóides portando cromossomos X e Y, e observaram que não

houve diferença significativa entre animais com e sem divisão externa do escroto. Porém, animais com divisão escrotal apresentaram maiores níveis séricos de testosterona.

CAPÍTULO I*

* Apresentado segundo normas da Revista Ciência Rural

**INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA, DO ACROSSOMO E
DAS MITOCÔNDRIAS ESPERMÁTICAS DE CAPRINOS SEGUNDO A
CONFORMAÇÃO ESCROTAL**

*INTEGRITY AND FUNCTIONALITY OF THE MEMBRANE, ACROSSOME AND
SPERMATIC MITOCHONDRY GOAT'S ACCORDING THE SCROTAL SHAPE*

Kamilla Figueiredo Vidigal^{1a}, José Adalmir Torres de Souza²; Tânia Vasconcelos
Cavalcante³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da conformação escrotal de caprinos sobre a integridade e funcionalidade da membrana plasmática, do acrossomo e das mitocôndrias espermáticas, além da correlação entre estes testes, e destes com a motilidade e vigor espermáticos. Para tanto, foram utilizados sete reprodutores entre 12 e 24 meses de idade, divididos em dois grupos. O Grupo 1 (n=4), animais sem divisão externa do escroto e o Grupo 2 (n=3), com divisão externa do escroto. O sêmen foi colhido com auxílio de vagina artificial (seis colheitas por animal), avaliado macro e microscopicamente, e, em seguida, criopreservado. Após descongelamento, realizou-se os testes específicos para avaliar a integridade e funcionalidade da membrana plasmática, do acrossomo e das mitocôndrias espermáticas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ao nível de 1% para comparação das médias que foram correlacionadas através do Coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados obtidos mostraram que a conformação escrotal influenciou na qualidade espermática referente às patologias, onde o grupo 1 expressou percentual de defeitos de cauda superior ao grupo 2. Para o parâmetro vigor, pós-descongelamento, o grupo 2 mostrou-se superior ao grupo 1. A conformação escrotal não influenciou na integridade e funcionalidade da membrana, do acrossomo e das mitocôndrias. Foram observadas correlações positivas entre o vigor e a motilidade espermática pós-descongelamento, entre espermatozoides com membranas íntegras através do HOST e através do teste com sondas fluorescentes, e entre a integridade do acrossomo e da membrana plasmática. Já a atividade mitocondrial e a integridade de membrana foram correlacionadas negativamente. Não houve correlação entre integridade das membranas plasmáticas, para ambos os testes (sondas fluorescentes ou HOST), com a motilidade espermática, assim como entre atividade mitocondrial e motilidade espermática. Conclui-se que,

¹Médica Veterinária, Mestre em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí; ² Professor Doutor, Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí; ³ Professora Doutora, Universidade Federal do Tocantins; ^a Correspondência: kamillavidigal@pop.com.br

sob as condições experimentais utilizadas neste trabalho, a conformação escrotal não influenciou na qualidade espermática, a exceção das patologias de cauda, pós-colheita; e do vigor, pós-descongelamento. A associação de testes clássicos e específicos na avaliação do sêmen, pode, com mais eficiência, prever a capacidade fertilizante de um ejaculado.

Palavras-chave: caprino; conformação escrotal; qualidade espermática

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of the goat's scrotal conformation on the integrity and functionality of the plasmatic membrane, on the acrosome and spermatic mitochondria, and the correlation among these tests and of these with the spermatic motility and vigour. Seven sires with 12 to 24 months old were used. They were divided into two groups, being the group 1 with four animals with no division on the external scrotum and group 2 with three animals with scrotal division. After collected with vagina artificial, the semen was macro and microscopically evaluated and frozen. After thawed the specific tests to evaluate the integrity and functionality of the plasmatic membrane, of the acrosome and spermatic mitochondria were carried. The data were analysed by the analyses of variance (ANOVA) and the means were compared by the Tukey test, 1%. The correlation analyses were taken using the Pearson's coefficient. Regarding the pathology, the scrotal shape affected the spermatic quality since the group 1 had more tail problems than the group 2. The after thawed vigour was higher in the group 2 than in the group 1. The scrotal shape had no effect on the membrane, acrosome and mitochondria integrity and functionality. Positive correlations were observed between vigour and after thawed spermatic motility, between sperm with intact membrane by the HOST and by the fluorescent probes and between the acrosomic and plasmatic membrane integrity. However, the mitochondrial activity and the membrane integrity were negatively correlated. There was no correlation between the integrity of the plasmatic membrane and the spermatic motility, nor between the mitochondrial activity and the spermatic motility. According to these findings the scrotal shape had no effect on the spermatic quality, except for tail defect after collected and vigor post-thawed. The tests are complementary and together they predict, with more efficiency, the ejaculate's fertilizing capacity.

Key words: goats; scrotal shape; spermatic quality

INTRODUÇÃO

A temperatura testicular é fator preponderante para que ocorra a espermatogênese podendo ser influenciada pela temperatura ambiente e umidade

relativa. Desta forma, a adaptação dos pequenos ruminantes domésticos ao meio ambiente em que são explorados favorece o seu desempenho reprodutivo.

A conformação escrotal “diferenciada” encontrada em caprinos criados em regiões áridas e semi-áridas do Leste da África (ROBERTSHAW, 1982) e em animais criados na região Nordeste do Brasil (NUNES et al., 1983), denominada por estes autores como “bolsa escrotal bipartida”, trata-se de uma adaptação destes animais às condições climáticas em que vivem. Animais que apresentam essa característica possuem um aumento nos parâmetros biométricos do testículo, na qualidade seminal e na eficiência reprodutiva em relação aos que não a possuem, uma vez que, esta condição amplia consideravelmente a superfície de cada testículo expondo-o à temperatura ambiente e propiciando melhor dissipação de calor (NUNES et al, 1983; SILVA e NUNES, 1988; CEZAR et al., 2002; ALMEIDA, 2003; AZEVEDO, 2005; NUNES, 2005; MACHADO JÚNIOR, 2005).

NUNES et al. (1983) e SILVA e NUNES (1988) avaliaram a influência da morfologia escrotal sobre as características do sêmen e seu efeito sobre a fertilidade de caprinos da raça Moxotó e constataram que o sêmen dos reprodutores com escroto bipartido apresentava melhor qualidade quando comparado com o de reprodutores com escroto não bipartido quando submetido ao teste de termorresistência.

CEZAR et al. (2002) encontraram maior concentração espermática no ejaculado de caprinos com divisão escrotal.

ALMEIDA (2003) apontou, em seu estudo, que animais com menor grau de divisão escrotal apresentavam maior percentual de defeitos espermáticos, e AZEVEDO et al. (2005) por sua vez, acrescentam, que animais com maior grau de divisão escrotal

apresentavam melhores valores de motilidade massal, vigor, motilidade individual e concentração espermática.

NUNES (2005) revelou a maior extensão da artéria testicular em animais que apresentam divisão externa do escroto, o que possibilita maior exposição do sangue arterial quente com o sangue venoso mais frio e, conseqüente diminuição da temperatura do sangue que chega ao testículo. Além disso, os estudos deste autor revelam que caprinos com divisão externa do escroto apresentam a pele escrotal constituída por camadas mais delgadas e com maior quantidade de glândulas sudoríparas o que favorece perda de calor.

MACHADO JÚNIOR (2005) evidenciou menores médias de temperatura do escroto e testículo em animais com maior grau de divisão escrotal, associando a esta característica um melhor mecanismo de termorregulação escroto-testicular e, conseqüentemente, melhor qualidade de sêmen. Esta diferença na temperatura testicular de caprinos com e sem divisão escrotal já havia sido retratada, também por LIMA JÚNIOR e VIANNI (1995).

SALVIANO et al. (2006) concluíram, em seu trabalho, não haver influência da conformação escrotal de caprinos sobre a integridade do DNA, apesar das concentrações de testosterona ter sido superior ($p < 0,05$) nos animais com divisão externa de escroto.

SILVA et al. (2008) avaliaram a influência da conformação escrotal sobre a proporção de espermatozóides portando cromossomos X e Y, e observaram que não houve diferença significativa entre animais com e sem divisão externa do escroto. Porém, animais com divisão escrotal apresentaram maiores níveis séricos de testosterona.

A avaliação seminal aplicada na rotina andrológica, baseia-se em testes que permitem avaliar características de motilidade, vigor, concentração e patologias espermáticas, fornecendo informações importantes a respeito da qualidade seminal. Entretanto, associa-se a esses testes uma imprecisão nos resultados, mesmo quando realizados por investigadores experientes, pois as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão relaciona-se, em parte, com a natureza subjetiva de alguns testes utilizados, com a variabilidade entre técnicos e com as diferenças na implementação de padrões para avaliação (ARRUDA, 2000).

Durante a avaliação dos ejaculados, é necessário considerar indicadores mais específicos da condição espermática. Técnicas que indiquem alterações de morfofuncionalidade nos compartimentos celulares devem auxiliar sobremaneira a identificação e seleção de grupos de gametas mais aptos a executar os eventos imprescindíveis à fecundação (GARCIA, 2006). Deste modo, a funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos.

A membrana plasmática do espermatozoide é de primordial importância na sobrevivência do espermatozoide no genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992), sendo composta por uma dupla camada de lipídeos, proteínas e carboidratos, é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico celular (AMANN e GRAHAM, 1993).

Nas células espermáticas esta estrutura encontra-se organizada em “domínios” bem delineados que diferem em composição e função, resultando na sua compartimentalização. A manutenção desses domínios é essencial para a funcionalidade espermática (PARKS e GRAHAM, 1992).

O acrossomo consiste em uma organela secretória, derivada do complexo de Golgi, preenchido com enzimas hidrolíticas, organizadas em uma matriz enzimática, que são liberadas durante a reação acrossomal, um evento essencial para a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito. Portanto, a integridade do acrossomo, bem como a manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização (SILVA e GADELLA, 2006).

As mitocôndrias espermáticas estão dispostas de forma helicoidal ao longo da peça intermediária, tendo como principal função realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP como fonte de energia metabólica. A membrana mitocondrial interna é o local de produção de energia, sendo essencial para a suplementação de ATP para o batimento flagelar, possibilitando a propulsão dos espermatozoides (AUGER et al., 1989; CELEGHINI, 2005; SILVA e GADELLA, 2006).

Diante do exposto, objetivou-se estudar a influência da conformação escrotal de caprinos sobre a integridade e funcionalidade da membrana plasmática, do acrossomo e das mitocôndrias espermáticas, além da correlação entre estes testes, e destes com a motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Local, animais e manejo**

O experimento foi realizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, com latitude 05°05'21" Sul, longitude 42°48'07" Oeste, altitude 72 m, temperatura média 27,3° e umidade relativa do ar 65%. Foram utilizados sete machos caprinos, com idades entre 12 e 24 meses, sem raça definida (SRD), divididos em 2 grupos experimentais, de acordo com a conformação

escrotal: G1 (n=4), sem divisão externa do escroto e G2 (n=3), com divisão externa do escroto (acima de 50% do comprimento testicular) (Figura 1). Por ocasião da formação dos grupos experimentais, foi realizado exame andrológico para a detecção de possíveis distúrbios reprodutivos e vermifugação dos animais que foram mantidos nas dependências do Setor de Caprinos do Departamento de Zootecnia, em sistema de semi-confinamento, com acesso ao pasto nativo, água e sal mineral *ad libitum*..



Figura 1. Região escrotal de caprinos dos diferentes grupos: **G1**- animais sem divisão externa do escroto; **G2**- animais com divisão externa do escroto.

- **Colheita e avaliação do sêmen**

Foram realizadas seis colheitas por animal, durante os meses de janeiro e fevereiro de 2007, realizadas sempre no período da manhã, em intervalos de 48 horas, com auxílio de vagina artificial, na presença de uma fêmea em estro natural ou induzido.

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto ao volume (mL), turbilhonamento (escala de 0 a 5), motilidade individual progressiva (%) e vigor (escala de 0 a 5), conforme as normas do CBRA (1998). A concentração e morfologia espermática foram avaliadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução do Centro de Ciências Agrárias, após conservação do material em solução formol-salina na proporção de 1:200, segundo o CBRA (1998).

- **Diluição e congelação do sêmen**

Após as avaliações imediatas o sêmen foi diluído em solução TRIS-gema em uma proporção pré-estabelecida de 1:9 (sêmen:diluidor) e encaminhado ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução onde realizou-se o envase em palhetas francesas de 0,25 mL, previamente identificadas com o número do animal e da partida (data da colheita), seguindo-se a congelação utilizando técnica de criopreservação automatizada (TK 3000) obedecendo a uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto até 5°C, com duração de aproximadamente 1 hora e 15 minutos e uma curva de congelação de –15°C/minuto de 5°C até –80°C e, posteriormente, 10°C/minuto até –120°C.

Após congeladas, as amostras de sêmen foram armazenadas em botijão criogênico até serem submetidas aos testes.

- **Descongelação do sêmen**

As amostras de sêmen foram descongeladas por imersão das palhetas em Banho-Maria à temperatura de 37°C, durante 30 segundos, seguindo-se avaliação de motilidade e vigor e, posteriormente, os testes de integridade da membrana plasmática, acrossomo e atividade mitocondrial.

- **Integridade estrutural e funcional da membrana plasmática**

A integridade da membrana plasmática foi avaliada a partir da aplicação da técnica descrita por HARRISON e VICKERS (1990) utilizando-se a mistura de corantes biológicos (sondas fluorescentes). Uma alíquota de 20 μ L do sêmen descongelado foi diluída em 1 mL de solução salina estoque, adicionada 40 μ L de solução corante e incubada em Banho-Maria a 37°C, durante 10 minutos, na ausência de luz. Uma alíquota de 10 μ L do material incubado foi depositada sobre uma lâmina, sobreposta com lamínula, e avaliada sob microscópio fluorescente com aumento de 100x, utilizando, de modo alternado, os filtros de fluoresceína (luz azul) e rodamina (luz verde) para os corantes Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) e Iodeto de Propídio (PI), respectivamente. Foram contadas 200 células por lâmina tendo como base a classificação proposta por HARRISON e VICKERS (1990):

- Categoria 1: acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e cauda - indica células espermáticas com membranas plasmáticas íntegras.
- Categoria 2: acúmulo de DIC (fluorescência verde) na peça intermediária e de PI (fluorescência vermelha) na cabeça - indica células com membranas plasmáticas e acrossomais danificadas e membranas mitocondriais íntegras.
- Categoria 3: acúmulo de DIC (fluorescência verde) na região acrossomal e peça intermediária e acúmulo de PI (fluorescência vermelha) na cabeça - indica células espermáticas com membranas acrossomais e mitocondriais íntegras e membranas plasmáticas danificadas.
- Categoria 4: acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e acúmulo de PI (fluorescência vermelha) na peça intermediária - indica células

espermáticas com membranas acrossomais e plasmáticas íntegras e membranas mitocondriais danificadas.

- Categoria 5: acúmulo de PI (fluorescência vermelha) ao longo da cabeça e cauda
 - indica células espermáticas com membranas acrossomais, plasmáticas e mitocondriais danificadas.

A funcionalidade da membrana foi avaliada utilizando-se o teste hiposmótico (Hypoosmotic Swelling Test, HOST). Após a descongelação, 250µL de sêmen foram misturados a 2mL da solução hiposmótica constituída por citrato tri-sódico e frutose obedecendo uma concentração de 125 mOsm/L, conforme FONSECA et al. (2005) e incubados em Banho-Maria a 37°C, durante 60 minutos. Em seguida, 20µL da solução contendo sêmen foram depositados sobre lâmina, coberta com lamínula, e observada em microscópio de contraste de fase com aumento de 100x.

Foram contados 200 espermatozóides por lâmina, registrando-se a percentagem dos que apresentaram endosmose positiva (cauda enrolada) seguindo o proposto por REVELL e MRODE (1994).

O cálculo do número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico foi feito utilizando a fórmula proposta por MELO e HENRY (1999), a saber:

$$\text{HOST\%} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST})$$

- **Integridade do acrossomo**

O acrossomo foi avaliado simultaneamente à integridade física da membrana plasmática, utilizando a coloração por sondas fluorescentes. Os dados foram classificados de acordo com ASSUMPÇÃO et al. (2002):

- Categoria 1: acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e cauda - indica espermatozóides não capacitados (acrossomo íntegro).
- Categoria 2: acúmulo de DIC (fluorescência verde) na peça intermediária e PI (fluorescência vermelha) na cabeça – indica espermatozóides capacitados (acrossomo danificado).
- Categoria 3: acúmulo de DIC (fluorescência verde) na região acrossomal e peça intermediária e acúmulo de PI (fluorescência vermelha) na cabeça - indica espermatozóides mortos.

- **Atividade mitocondrial**

A atividade mitocondrial foi determinada a partir da incubação do sêmen em meio contendo Diaminobenzidine dissolvido em fosfato de Sódio, 0,15M, pH 7,2, a uma concentração de 1mg/mL e manuseado na ausência de luz.

Uma alíquota de 250µL de sêmen (pós-descongelamento) foi adicionada a 750µL do meio de incubação, homogeneizada em tubo aberto, colocada em Banho-Maria a 37°C, durante 60 minutos, na ausência de luz. Após a incubação, foi preparado um esfregaço da suspensão, fixado em formaldeído a 10%, por 10 minutos, lavados e secos ao ar. Foram avaliados 200 espermatozóides, em objetiva de 100x, sob imersão em óleo, usando microscopia de contraste de fase. A atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozóides foi classificada seguindo o proposto por HRUDKA (1987):

- Classe 1: Bainha mitocondrial com aparência de um cilindro compacto e proeminente – indica que quase todas as mitocôndrias são ativas.

- Classe 2: Bainha mitocondrial fragmentada – indica segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos.
- Classe 3: Bainha mitocondrial poucas mitocôndrias dispersas – indica espermatozóides com menos da metade das mitocôndrias ativas.
- Classe 4: Bainha mitocondrial sem impregnação do corante – indica espermatozóides completamente inativos.

Cada classe da escala foi multiplicada por um fator de correção, como segue: 1:1,00; 2:0,50; 3:0,25; 4:0,00. Desta forma, foi calculado o índice de atividade citoquímica (IAC), multiplicando-se o número de espermatozóides encontrados em cada uma das classes pelo seu escore relativo.

- **Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para um delineamento inteiramente casualizado, seguido do teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de 1% de probabilidade.

As médias obtidas a partir da aplicação dos testes foram correlacionadas através do Coeficiente de Correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à avaliação clássica do sêmen, pós-colheita, estão expressos na tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos para os parâmetros avaliados, exceto para defeitos de cauda, estando em acordo com os resultados de ALMEIDA (2003) que encontrou diferença entre animais com e sem “bipartição” escrotal apenas para defeitos totais.

Tabela 1. Médias e desvios padrões para volume, motilidade, vigor, turbilhão, concentração, defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária e defeitos de cauda, de espermatozóides caprinos, sem (G1) e com (G 2) divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008

Parâmetros	Grupos	
	G1 (n=24 amostras)	G2 (n=18 amostras)
Volume (mL)	0,79 ± 0,50 ^a	0,48 ± 0,26 ^a
Turbilhonamento (0-5)	3,20 ± 0,12 ^a	3,27 ± 0,15 ^a
Motilidade (%)	86,25 ± 0,13 ^a	84,72 ± 0,14 ^a
Vigor (0-5)	3,54 ± 0,35 ^a	3,33 ± 0,43 ^a
Concentração (x10⁶/mm³)	2,27 ± 0,49 ^a	2,17 ± 0,72 ^a
Defeitos de cabeça (%)	2,79 ± 2,73 ^a	1,27 ± 1,43 ^a
Defeitos de peça intermediária (%)	1,56 ± 1,42 ^a	0,91 ± 0,77 ^a
Defeitos de cauda (%)	8,02 ± 5,86 ^a	3,69 ± 2,33 ^b

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

O volume seminal foi de 0,79 ± 0,50 para o grupo 1 e de 0,48 ± 0,26 para o grupo 2 estando dentro dos limites da normalidade para a espécie caprina que varia entre 0,2 a 2,0 mL segundo MIES FILHO (1987). Considerando a conformação escrotal, NUNES et al. (1983) também verificaram valores inferiores a 1,0 mL nos dois grupos de animais trabalhados (0,37 e 0,30), não havendo diferença estatística entre animais com e sem “bipartição”. Da mesma forma, FELICIANO-SILVA e NUNES (1988) não observaram diferença significativa para esta característica, entre os grupos com e sem bipartição, no período seco e chuvoso (0,37 e 0,30; e 0,70 e 0,60, respectivamente). Já FELICIANO-SILVA et al. (1986) constataram valores superiores no grupo de animais com escroto “bipartido” (1,2 mL) em relação ao grupo com escroto não “bipartido” (0,48 mL).

O turbilhonamento com valores de $3,20 \pm 0,12$ e $3,27 \pm 0,15$ para os grupos 1 e 2, respectivamente, encontra-se em concordância com o padrão para o sêmen de caprinos, devendo ser igual ou superior a 3 (NUNES et al., 1997). NUNES et al. (1983) também não observaram influência da conformação escrotal sobre esta característica, tendo encontrado valores de $3,56 \pm 0,82$ e $3,36 \pm 0,70$ para animais com escroto “bipartido” e não “bipartido”, respectivamente.

A motilidade teve percentuais médios de $86,25 \pm 0,13$ e $84,72 \pm 0,14$ para os grupos 1 e 2, respectivamente, estando dentro dos limites aceitáveis pelo CBRA (1998) que é de 80%. CEZAR et al. (2002) observaram valores percentuais de motilidade que variaram de 88,7, para animais sem “bipartição” escrotal (grau 0) a 92,14 em animais com grau máximo de “bipartição” (grau 2).

Quanto ao vigor espermático, obteve-se médias de $3,54 \pm 0,35$ e $3,33 \pm 0,43$ para os grupos 1 e 2, respectivamente. Estes valores obedecem aos limites estabelecidos por MIES FILHO (1987) e HAFEZ (1996), que deve ser igual ou superior a 3. Porém, foram, numericamente, inferiores aos verificados por CEZAR et al. (2002) que obtiveram médias de 4,70; 4,67 e 4,86 para animais de escroto não “bipartido” (grau 0), “bipartição” parcial (grau 1) e “bipartição” total (grau 2), respectivamente.

A concentração espermática, expressa pelo número de espermatozóides por mm^3 foi de $2,27 \times 10^6 \pm 0,49$ e $2,17 \times 10^6 \pm 0,72$ para os grupos 1 e 2, respectivamente, estando dentro dos padrões fixados pelo CBRA (1998). Comparando animais com e sem “bipartição” escrotal, outros autores também não verificaram diferenças quanto a este padrão, onde a variação manteve-se entre $3,94 \times 10^6$ e $3,98 \times 10^6$ spz's/ mm^3 , respectivamente (NUNES et al., 1983; FELICANO-SILVA et al., 1986; FELICANO-SILVA e NUNES, 1988). No entanto, CEZAR et al. (2002) observaram maior

concentração espermática no ejaculado de animais com “bipartição” escrotal em ralação ao grupo sem “bipartição” ($2,64$ e $1,60 \times 10^6/\text{mm}^3$, respectivamente).

Dentre as patologias ou defeitos espermáticos verificou-se que o grupo 1 apresentou maior percentagem de espermatozóides com defeitos de cauda ($8,02 \pm 5,86$) comparado ao grupo 2 ($3,69 \pm 2,33$). Da mesma forma, outros autores observaram que a conformação escrotal influenciou na percentagem de patologias espermáticas, de modo que animais sem divisão externa do escroto apresentaram maior quantidade de espermatozóides defeituosos em relação aos que apresentam esta característica. A média de patologias encontrada por esses autores foi de 22,20%, para animais sem “bipartição” e 5,42%, para animais com “bipartição” do escroto (NUNES et al., 1983; FELICIANO-SILVA e NUNES, 1988; ALMEIDA, 2003).

A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados novamente após a descongelção (Tabela 2), com o intuito de comparar os grupos estudados, além de correlacionar estes parâmetros com os demais testes realizados neste experimento.

Tabela 2. Médias e desvios padrões para a motilidade e vigor espermáticos pós-descongelção de espermatozóides caprinos sem (G1) e com (G 2) divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008

Parâmetros	Grupos	
	G1 (n=24 amostras)	G2 (n=18 amostras)
Motilidade pós- descongelção	$37,08 \pm 1,33^a$	$51,66 \pm 1,23^a$
Vigor pós-descongelção	$2,45 \pm 0,14^a$	$3,05 \pm 0,11^b$

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os valores percentuais da motilidade pós-descongelção não evidenciaram superioridade de um grupo em relação ao outro. Por outro lado, quanto ao vigor, o grupo 1 revelou média inferior ($2,45 \pm 0,14$) comparado ao grupo 2 ($3,05 \pm 0,11$),

sugerindo que o sêmen de animais com divisão externa do escroto suporte melhor os danos causados pelo choque térmico durante o processo de congelação e descongelação. Os procedimentos utilizados para a criopreservação do sêmen (diluição, resfriamento, congelação e descongelação) são bem conhecidos por causarem danos aos espermatozóides (HAMMERSTEDT et al., 1990). De modo geral, os valores de motilidade e vigor pós-descongelação estão de acordo com os relatos de que o processo de criopreservação causa um decréscimo de cerca de 50% da viabilidade espermática decorrente dos efeitos de temperatura e osmolaridade, (AMMAN e PICKETT, 1987; THOMAS et al., 1998), fato este, traduzido pela baixa percentagem de espermatozóides móveis.

Para a avaliação das membranas plasmáticas através da coloração com sondas fluorescentes, agrupou-se as cinco categorias estabelecidas na metodologia da seguinte forma: categoria 1, membranas íntegras (coloração verde); categoria 2, membranas parcialmente danificadas (coloração verde e vermelha) e categoria 3, membranas danificadas (coloração vermelha), conforme demonstrado na figura 2.

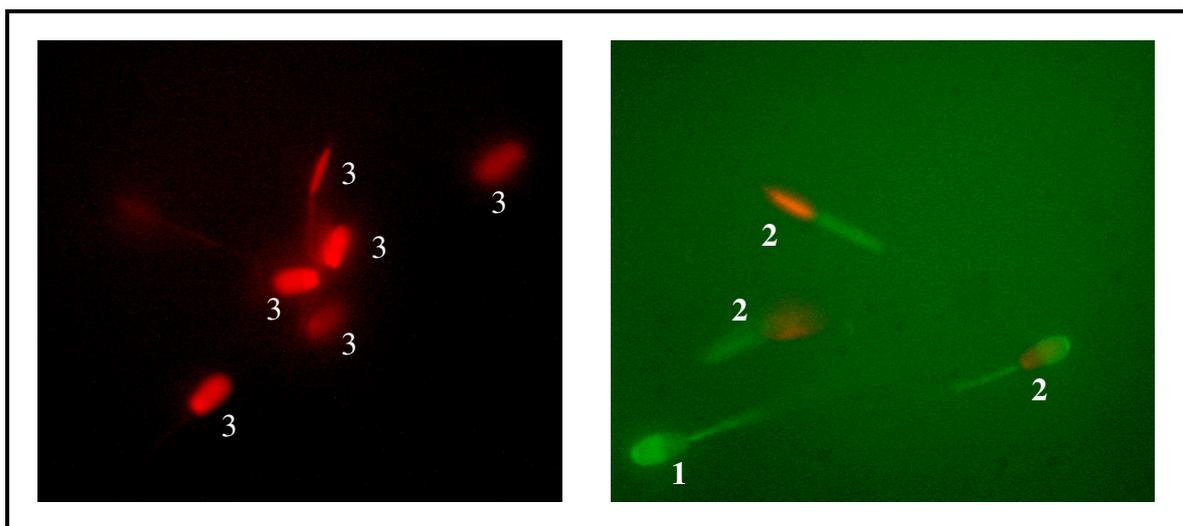


Figura 2. Espermatozóides corados com DIC e PI: 1- membranas íntegras; 2- membranas parcialmente danificadas; 3- membranas danificadas (Aumento de 100x).

As percentagens de membranas íntegras (categoria 1) foram de $44,69 \pm 20,55$ e $49,55 \pm 20,88$, para membranas parcialmente danificadas (categoria 2) foram de $53,27 \pm 20,89$ e $48,28 \pm 20,97$ e para membranas danificadas (categoria 3) foram de $2,04 \pm 1,66$ e $2,16 \pm 2,61$, para os grupos 1 e 2, respectivamente. Deste modo, não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto à integridade das membranas plasmáticas (Tabela 3).

Tabela 3. Médias e desvios padrões para a integridade da membrana plasmática (sondas fluorescentes) de espermatozóides caprinos, sem (G1) e com (G 2) divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008

Categorias (%)	Grupos	
	G1 (n=24 amostras)	G2 (n=18 amostras)
Íntegra	$44,69 \pm 20,55^a$	$49,55 \pm 20,88^a$
Parcialmente danificada	$53,27 \pm 20,89^a$	$48,28 \pm 20,97^a$
Danificada	$2,04 \pm 1,66^a$	$2,16 \pm 2,61^a$
Total	100	100

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

SODERQUIST et al. (1997), relacionando temperatura e tempo de descongelação de sêmen caprino, observaram altas taxas de integridade da membrana espermática para as amostras descongeladas a 70°C durante 5 segundos e a 50°C durante 9 segundos ($50,5 \pm 1,5$ e $47,3 \pm 1,5$, respectivamente) comparadas às amostras descongeladas a 35°C por 12 segundos ($41,7 \pm 1,5$). Estes valores foram próximos aos observados neste estudo, onde as amostras foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos.

BRISOLA et al. (1999) verificaram percentagens de membranas íntegras, parcialmente danificadas e danificadas de 34,42, 9,94, 53,64 e 33,62, 7,94 e 58,44, para sêmen ovino, criopreservado, utilizando etilenoglicol e glicerol, respectivamente. No presente estudo, utilizando o glicerol como crioprotetor, encontrou-se valores semelhantes, aos do autor citado, para membranas íntegras; superior, para membranas parcialmente danificadas; e inferior, para membranas danificadas.

AZERÊDO et al. (2001), avaliaram o efeito da remoção do plasma seminal e da congelação do sêmen sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozóides caprinos e verificaram médias de $32,99 \pm 12,99$; $26,21 \pm 12,79$ e $3,11 \pm 2,76$ e $2,85 \pm 1,86$, para membranas íntegras; $9,72 \pm 5,09$; $10,46 \pm 2,45$ e $10,94 \pm 4,99$ e $10,24 \pm 3,13$, para membranas parcialmente danificadas e $57,54 \pm 11,43$; $60,19 \pm 12,54$ e $83,15 \pm 6,31$ e $83,36 \pm 4,87$, para membranas danificadas utilizando sêmen fresco e descongelado, com e sem remoção do plasma seminal. Os resultados encontrados neste estudo, utilizando sêmen descongelado e sem remoção do plasma seminal, são superiores, para membranas íntegras e parcialmente danificadas; e inferiores, para membranas danificadas.

CAVALCANTE (2003), estudando a fertilidade de machos caprinos das raças Boer e Alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva, observou percentagens de $20,33 \pm 15,03$ e $30,01 \pm 17,57$ de membranas íntegras, $77,47 \pm 5,69$ e $66,52 \pm 43,77$ de membranas parcialmente danificadas e $2,20 \pm 3,86$ e $3,47 \pm 4,24$ de membranas danificadas, para o sêmen pós-descongelação. Esses valores foram, numericamente, inferiores aos deste estudo para membranas íntegras; superiores para membranas parcialmente danificadas e semelhantes para membranas danificadas.

A viabilidade funcional da membrana plasmática (teste hiposmótico – HOST) expressa pela torção da cauda dos espermatozóides é apresentada na figura 3.

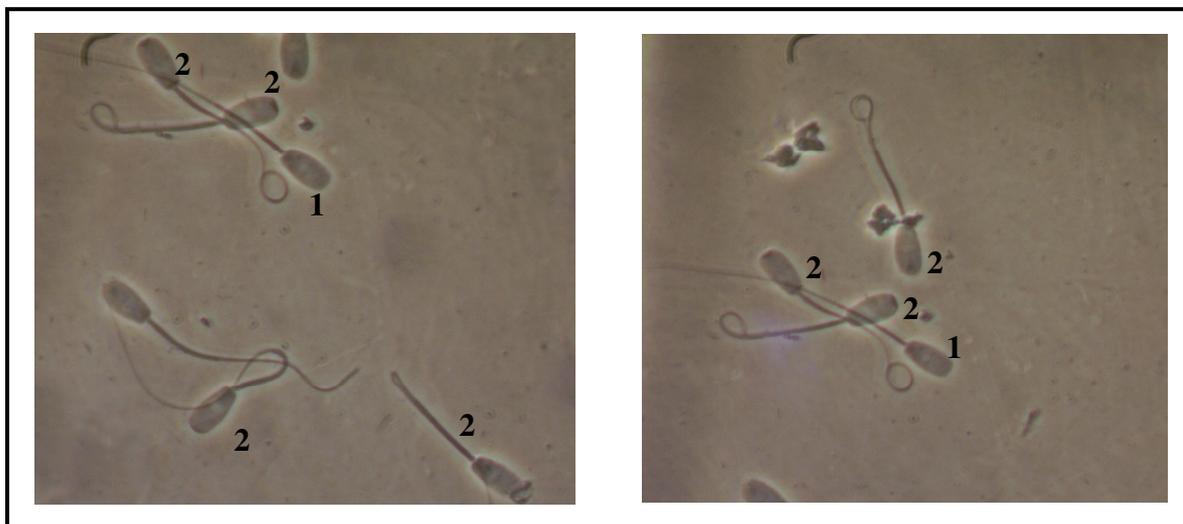


Figura 3. Espermatozóides submetidos ao HOST: **1-** espermatozóide com membrana plasmática danificada; **2-** espermatozóide com membrana plasmática íntegra (Aumento de 100x).

As médias observadas para os grupos 1 e 2 para membrana íntegra foram $34,91 \pm 13,88$ e $36,50 \pm 11,82$, e para membrana danificada foram $65,08 \pm 13,88$ e $63,50 \pm 11,82$ (Tabela 4). Deste modo, a conformação escrotal, provavelmente, não influenciou na funcionalidade da membrana plasmática espermática.

Tabela 4. Médias e desvios padrões para a integridade da membrana plasmática (HOST) de espermatozóides caprinos, sem (G1) e com (G 2) divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008

Categorias (%)	Grupos	
	G1 (n=24 amostras)	G2 (n=18 amostras)
Íntegra (funcional)	$34,91 \pm 13,88^a$	$36,50 \pm 11,82^a$
Danificada (não funcional)	$65,08 \pm 13,88^a$	$63,50 \pm 11,82^a$
Total	100	100

Médias seguidas de letras minúsculas e iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Os resultados deste estudo foram similares aos de SANTOS et al. (2001) que encontraram médias de $36,3 \pm 10,6$ e $39,8 \pm 15,0$, para membranas funcionais, em sêmen de caprinos jovens e adultos, pós-descongelção, utilizando solução a 60 mOsmol; e aos de SALGUEIRO et al. (2003) que, avaliando a qualidade do sêmen caprino pós-descongelção, encontraram percentagens de 96 e 31% de células com membrana funcional para sêmen fresco e descongelado, respectivamente. Entretanto, FONSECA et al. (2001) e BITTENCOURT et al. (2005), utilizando a mesma osmolaridade deste estudo, observaram médias de espermatozóides reativos ao HOST superiores (62,75 e 52,6%, respectivamente) às encontradas neste trabalho.

Para avaliar o acrossomo, utilizou-se a classificação proposta por ASSUMPÇÃO et al. (2002). A primeira categoria, espermatozóides verdes em toda sua extensão, correspondeu aos espermatozóides não capacitados (acrossomo íntegro); a segunda categoria, espermatozóides com cabeça vermelha e com peça intermediária verde, correspondeu aos espermatozóides capacitados (acrossomo danificado); e a terceira categoria, espermatozóides com acrossomo e peça intermediária verdes e região posterior da cabeça vermelha, correspondeu aos espermatozóides mortos (Figura 4). Além destas, encontrou-se outras duas categorias, onde os espermatozóides apresentavam a cabeça toda verde e a peça intermediária vermelha, e outra com espermatozóides vermelhos em toda sua extensão. Estas últimas categorias, encontradas com pouca freqüência, foram agrupadas e receberam a denominação de “outras categorias”, por não se enquadrarem na classificação original proposta por ASSUMPÇÃO et al. (2002).

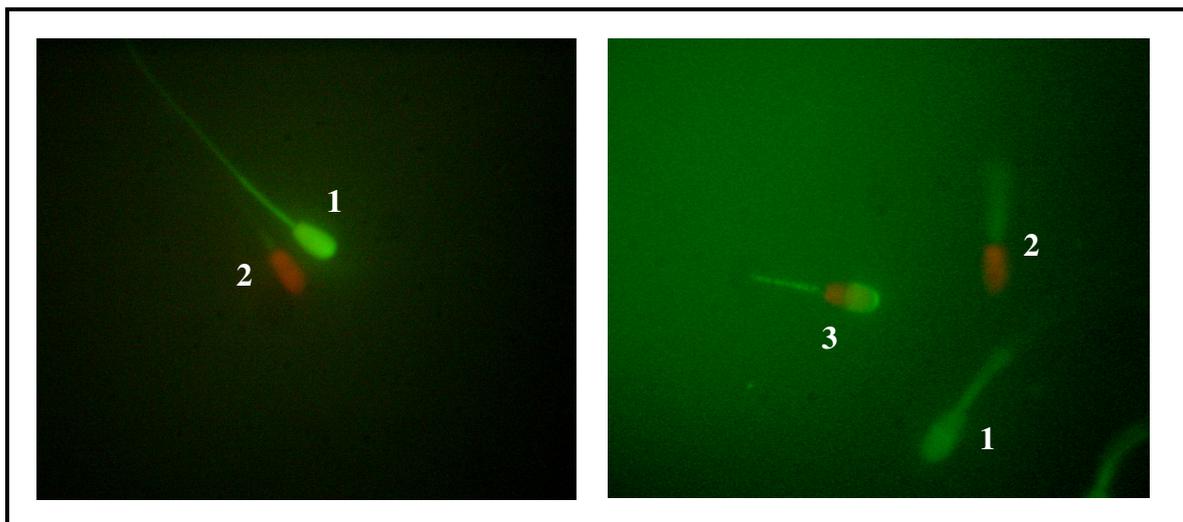


Figura 4. Espermatozoides corados com DIC e PI: **1-** acrossomo íntegro; **2-** acrossomo danificado; **3-** espermatozoides mortos (Aumento de 100x).

As médias encontradas de $44,69 \pm 20,55$ e $49,55 \pm 20,88$, para espermatozoides com acrossomo íntegro; $36,81 \pm 23,62$ e $30,11 \pm 23,57$, para células com acrossomo danificado e $16,33 \pm 7,37$ e $18,13 \pm 9,05$, para espermatozoides mortos (Tabela 5). Deste modo, não foi evidenciada diferença entre os grupos 1 e 2 para a integridade acrossomal.

Tabela 5. Médias e desvios padrões para a integridade do acrossomo espermático de caprinos, sem (G1) e com (G 2) divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008

Categorias (%)	Grupos	
	G1 (n=24 amostras)	G2 (n=18 amostras)
Espermatozóide não capacitado (acrossomo íntegro)	44,69 ± 20,55 ^a	49,55 ± 20,88 ^a
Espermatozóide capacitado (acrossomo danificado)	36,81 ± 23,62 ^a	30,11 ± 23,57 ^a
Espermatozóide Morto	16,33 ± 7,37 ^a	18,13 ± 9,05 ^a
Outras categorias	2,16 ± 1,65 ^a	2,19 ± 2,62 ^a
Total	100	100

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

ASSUMPCÃO et al. (2002) utilizaram o cálcio como agente capacitor espermático para sêmen bovino e avaliaram integridade do acrossomo aplicando a mesma metodologia deste trabalho, observando médias superiores para a categoria acrossomo íntegro (58,38%), semelhantes para acrossomo danificado (36,41%) e superiores para espermatozoides mortos (5,21%).

NASCIMENTO (2006) utilizando os corantes PI e FITC-PSA, verificou percentagem de 82,4 ± 7,6 de membranas acrossomais intactas em sêmen equino; sendo superior à média observada neste estudo.

RAPHAEL (2007) utilizando os corantes PI e FITC-PSA e trabalhando com sêmen equino resfriado por 72h, observou, às 24h, percentagem de 35,06 ± 3,7 para acrossomos danificados, semelhante ao observado neste trabalho. Entretanto,

GONZALEZ (2004) observou percentagem de $16,68 \pm 1,31$ de acrossomos danificados, utilizando técnica automatizada de congelação e glicerol como crioprotetor, para sêmen de equino, o que foi inferior ao observado neste trabalho.

Os espermatozóides que foram classificados, neste trabalho, em “outras categorias”, não foram mencionados por ASSUMPCÃO et al. (2002). Entretanto foram observados por HARRISON e VICKERS (1990) ao utilizarem o mesmo teste, porém com a finalidade de avaliar a integridade das membranas plasmáticas.

Quanto à atividade mitocondrial, observa-se na figura 5, as diferentes classificações, que se revelam a partir da impregnação do Diaminobenzidine sobre as mitocôndrias funcionais (ativas).

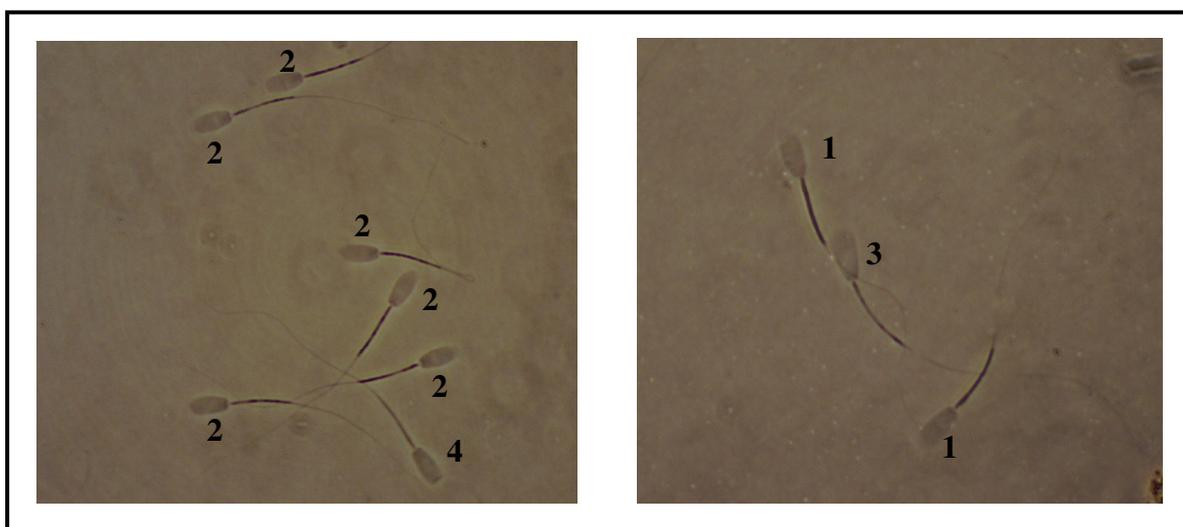


Figura 5. Espermatozóides caprinos corados com DAB: **1-** quase todas as mitocôndrias ativas; **2-** mitocôndrias ativas e inativas com predominância das ativas; **3-** menos da metade das mitocôndrias ativas; **4-** nenhuma mitocôndria ativa (Aumento de 100x).

O índice de atividade citoquímica foi de 50,98 e 55,71 para os grupos 1 e 2, respectivamente (Tabela 6), sendo que a conformação escrotal não influenciou a atividade mitocondrial.

Tabela 6. Médias e desvios padrões para o número de espermatozóides e índice de atividade citoquímica, por classes, avaliadas no sêmen de caprinos, sem (G1) e com (G 2) divisão externa do escroto, Teresina-PI, 2008

Classes	Grupos			
	G1 (n=24 amostras)		G2 (n=18 amostras)	
	Nº sptz	IAC	Nº sptz	IAC
1	60,96 ± 37.40 ^a	30,48	78,17 ± 22.63 ^a	39,08
2	63,08 ± 21.28 ^a	15,77	56,55 ± 27.57 ^a	14,13
3	37,87 ± 32.57 ^a	4,73	20,05 ± 9.34 ^a	2,50
4	29,91 ± 17.38 ^a	0	45,11 ± 22.54 ^a	0
TOTAL (IAC)	-	50,98 ^a	-	55,71 ^a

1- quase todas as mitocôndrias ativas; 2- mitocôndrias ativas e inativas com predominância das ativas; 3- menos da metade das mitocôndrias ativas; 4- nenhuma mitocôndria ativa; IAC- índice de atividade citoquímica.

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

CAVALCANTE et al. (2005), trabalhando com sêmen de caprinos, e aplicando igual metodologia de avaliação da atividade mitocondrial, obtiveram índices superiores aos encontrados neste trabalho, sendo de 66,00 e 67,25 para o sêmen descongelado, de animais das raças Boer e Alpina, respectivamente.

Estudos sobre a atividade mitocondrial têm sido bem explorados na espécie equina. Neste sentido, RAPHAEL (2007), utilizando uma combinação entre os corantes PI, FITC-PSA e JC-1 para avaliar simultaneamente membrana plasmática, acrossomo e função mitocondrial, encontrou, após 24h de refrigeração do sêmen equino, média de 51,90 de potencial de membrana mitocondrial em um dos animais estudados. Este

resultado foi numericamente próximo ao deste trabalho. Entretanto, GONZALEZ (2004) usando os corantes PI, FITC-PSA e JC-1, observou média de função mitocondrial de 19,10 e NASCIMENTO (2006) utilizando PI, FITC-PSA e MITO, obteve média de 41,20, as quais foram inferiores às do presente estudo.

Todos os testes realizados foram correlacionados entre si e com a motilidade e o vigor espermáticos pós-descongelção (Tabela 7), a fim de avaliar a habilidade destes, em prever a capacidade fertilizante de um ejaculado.

Foi observada correlação positiva entre o vigor e a motilidade espermática pós-descongelção, sendo indicativo de certo grau de dependência entre essas variáveis.

Não houve correlação entre integridade das membranas plasmáticas, para ambos os testes (sondas fluorescentes e HOST), com a motilidade espermática, igualmente ao observado por MELO et al. (2005), quando utilizaram o HOST para avaliar a viabilidade do sêmen equino. As lesões da membrana podem não estar associadas à perda da motilidade espermática (LIN et al., 1998). Isto porque a motilidade dos espermatozoides não depende exclusivamente do transporte de elementos através da membrana, mas de inúmeros fatores bioquímicos (MOHANACHANDRAN NAIR et al., 1998). Contudo, outros trabalhos correlacionaram positivamente integridade da membrana plasmática e motilidade espermática, a partir da aplicação do HOST (MELO, 1999 e SILVA et al. 2006) e da utilização do HOST e das sondas fluorescentes (SOUZA et al. 2001).

Houve correlação positiva entre os testes HOST e coloração com sondas fluorescentes. Constatação similar foi observada por NEILD et al. (1999), que estudaram sêmen de equinos. Entretanto, VASQUEZ et al. (1997) encontraram diferença significativa entre esses testes trabalhando com sêmen suíno.

O HOST é capaz de avaliar funcionalidade da membrana plasmática, especialmente da cauda (JEYENDRAN et al., 1984), enquanto que as sondas fluorescentes avaliam principalmente as membranas da cabeça espermática (HARRISON e VICKRES, 1990). Porém, estas afirmações não invalidam a utilização do HOST para avaliação da membrana da cabeça e a utilização das sondas para a cauda (SOUZA et al., 2001), conforme demonstra a correlação entre os dois testes.

Houve correlação positiva entre a integridade do acrossomo e da membrana plasmática. Este achado encontra respaldo nas afirmações de WATSON et al. (1987), ao mencionarem que a lesão das membranas na região da cabeça do espermatozóide parece ser progressiva, começando com a membrana plasmática e, posteriormente, envolvendo o acrossomo. CHAN et al. (1996), relatam que a integridade da membrana acrossomal pode estar relacionada com a integridade de outras membranas.

A atividade mitocondrial e a integridade de membrana se correlacionaram negativamente. Segundo WATSON et al. (1987) a mitocôndria pode se apresentar inativa enquanto a membrana permanece intacta.

Não houve correlação entre atividade mitocondrial e motilidade espermática, corroborando com SILVA e GADELLA (2006) quando relatam a existência de enzimas, envolvidas na glicólise, na bainha fibrosa da cauda. Entretanto, outros autores afirmam ser indispensável a produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (PAPAIIOANNOU et al., 1997; CONNELL et al., 2002).

Tabela 7. Coeficientes de correlação entre a motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento e testes especializados para avaliação do sêmen

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	0,48*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,0001														
C	0,11	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,46	0,50													
D	-0,09	-0,08	-0,99 [#]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,55	0,58	0,0001												
E	-0,21	-0,16	0,06	-0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,17	0,29	0,69	0,30											
F	0,09	0,15	0,60*	-0,59 [#]	-0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,54	0,31	0,0001	0,0001	0,49										
G	-0,09	-0,15	-0,60 [#]	0,59*	0,10	-1,00 [#]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,54	0,31	0,0001	0,0001	0,49	0,0001									
H	0,11	0,10	1,00*	-0,99 [#]	0,06	0,60*	-0,60 [#]	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,46	0,50	0,0001	0,0001	0,69	0,0001	0,0001								
I	-0,06	-0,03	-0,93 [#]	0,94*	-0,15	-0,47 [#]	0,47*	-0,93 [#]	-	-	-	-	-	-	-
	0,69	0,80	0,0001	0,0001	0,33	0,001	0,001	0,0001							
J	-0,05	-0,11	0,17	-0,17	0,03	-0,13	0,13	0,17	-0,49	-	-	-	-	-	-
	0,72	0,48	0,27	0,26	0,83	0,39	0,39	0,27	0,0008						
K	0,21	-0,06	0,27	-0,26	0,08	0,24	-0,24	0,27	-0,30	0,18	-	-	-	-	-
	0,16	0,69	0,07	0,08	0,58	0,12	0,12	0,07	0,05	0,23					
L	-0,25	-0,10	-0,37 [#]	0,37*	-0,04	-0,24	0,24	-0,37 [#]	0,32	0,02	-0,12	-	-	-	-
	0,09	0,52	0,01	0,01	0,77	0,11	0,11	0,01	0,03	0,85	0,44				
M	-0,12	0,07	-0,01	0,01	0,003	-0,04	0,04	-0,01	0,10	-0,27	-0,81 [#]	-0,23	-	-	-
	0,41	0,64	0,92	0,92	0,98	0,78	0,78	0,92	0,49	0,07	0,0001	0,14			
N	0,18	0,05	0,10	-0,12	0,15	0,02	-0,02	0,10	-0,15	0,14	0,05	-0,61 [#]	-0,15	-	-
	0,25	0,72	0,50	0,44	0,32	0,89	0,89	0,50	0,32	0,35	0,71	0,0001	0,32		
O	0,11	-0,09	0,15	-0,13	-0,09	0,15	-0,15	0,15	-0,19	0,22	0,91*	0,24	-0,88 [#]	-0,18	-
	0,46	0,56	0,34	0,38	0,55	0,32	0,32	0,34	0,20	0,15	0,0001	0,12	0,0001	0,23	

A- motilidade pós-descongelamento; **B-** vigor pós-descongelamento; **C-** MP íntegras (sondas fluorescentes); **D-** MP parcialmente danificada (sondas fluorescentes); **E-** MP danificadas (sondas fluorescentes); **F-** MP íntegras (HOST); **G-** MP danificadas (HOST); **H-** spz's não-capacitados (acrossoma íntegro); **I-** spz's capacitados (acrossoma anificado); **J-** spz's mortos; **K-** spz's com mais da metade das mitocôndrias ativas; **L-** spz's com metade das mitocôndrias ativas; **M-** spz's com menos da metade das mitocôndrias ativas; **N-** spz's com todas as mitocôndrias inativas; **O-** IAC; Correlação de Pearson - *positiva a 1%; [#]negativa a 1%.

CONCLUSÃO

A conformação escrotal influenciou a patologia da cauda, na pós-colheita, e o vigor, após descongelamento.

A integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias não foram influenciadas pela conformação escrotal.

As correlações entre os testes aplicados indicam que a associação de testes clássicos e específicos na avaliação do sêmen, pode, com mais eficiência, predizer a capacidade fertilizante de um ejaculado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALMEIDA, M. M. **Vascularização arterial testicular e escrotal de caprinos nativos do Estado do Piauí, segundo grau de divisão do escroto, e a relação com parâmetros reprodutivos**. 2003. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7; p- 145-173, 1987.

AMMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKinnon A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p 715-745.

ARRUDA, R. P. de. **Avaliação dos efeitos de diluidotes e crioprotetores para espermatozoides equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfologia (ASMA)**. 2000. 85f. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ASSUMPCÃO; M. E. O. D'AVILA; HAIPEÇK, K.; LIMA, A. S. et al. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilin Journal Veteriary Research and Animal Science**, v. 39, p.149-156, 2002.

AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology**, v. 10, p., 439-448, 1989.

AZERÊDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.

AZEVEDO, L. M.; VIEIRA, R. J.; SILVA, J. M.; et al. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen de caprinos. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2005, Teresina. **Anais...** Piauí: CBRA. 2005. CD-ROM.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; SANTOS, A. D. F. et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p.213-218, 2005.

*NBR 6023

BRISOLA, L. B. de S.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D. et al. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozóides ovinos criopreservados com etilenoglicol. **Ciência Rural**, v. 29, p. 527-531, 1999.

CAVALCANTE, T. V. **concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos das raças boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva**. 2003. 77f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Veterinárias e Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAVALCANTE, T. V.; ESPER, C. R.; FERREIRA, J. L. et al. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozóides pós-colheita e pós-descongelção de caprinos das raças boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva. **Arquivos of Veterinary Science**, v.10, p. 89-93, 2005.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. 1998.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CEZAR, K. L. R.; GUERRA, M. M. P.; SANTOS, R. M. B. et al. A influência da configuração escrotal sobre a eficiência reprodutiva de caprinos nativos criados no sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, p. 115-117, 2002.

CHAN, P. J.; CORSELLI, J. U.; JACOBSON, J. D.; et al. Correlation between intact sperm acrosome using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. **Archives of Andrology**, v. 36, p. 25-27, 1996.

CONNELL, M. O.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction** v. 17, p. 704-709, 2002.

FELICIANO-SILVA, A. E. D.; NUNES, J. F.; MELO, F. A. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen e seus efeitos na fertilidade de caprinos. **A Hora Veterinária**, v.5, p. 66-69, 1986.

FELICIANO-SILVA, A. E. D.; NUNES, J. F. **Comportamento sexual do macho caprino da raça Moxotó às variações estacionais no Nordeste do Brasil**. Sobral: EMBRAPA/CNPC, 1988, 17P. (Boletim de Pesquisa, 6).

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; ROVAY, H. et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 436-457, 2001.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 139-144, 2005.

GARCIA, A. R. O uso das sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 3. 2006. Belém. **Anais...** Pará: CBRA. 2006. CR-ROM.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino.** 2004. 92 f. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal.** 6 ed. São Paulo: Manole, 1996. 582 p.
HAMMERSTEDT, R. H; GRAHAN, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask then to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p. 73-88, 1990

HARRISSON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 19, p. 809-828, 1987.

JEYENDRAN, R.S.; VEN, H.H.V.; PELAEZ, M.P. et al. Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

LIMA JÚNIOR, A. D.; VIANNI, M. C. E. Efeito da morfologia da bolsa escrotal na termorregulação em caprinos nativos no Nordeste do Brasil. **Ciência da Vida**, v. 17, p. 97-107, 1995.

LIN, M.; MORSHEDI, M.; SRISOMBUT, C. et al. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of hypoosmotic swelling test, the water test, and cosin-Y staining. **Fertility and Sterility**, v. 70, p. 1148-1155, 1998.

MACHADO JÚNIOR, A. A. N. **Influência da morfologia escrotal sobre a termorregulação, a biometria escroto-testicular e o comportamento sexual de caprinos nos períodos seco e chuvoso do Estado do Piauí.** 2005, 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51; p.71-78, 1999.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p.757-763 2005.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4 ed., v. 1, Porto Alegre: Sulina, 1987. 364 p.

MOHANACHANDRAN NAIR, S. R.; KALATHARAN, J.; RAMAN, K. S. et al. Evaluation of canine frozen semen by hypoosmotic swelling test. **Indian Journal of Animal Science**, v. 68, p.1179-1180, 1998.

NASCIMENTO J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides eqüinos criopreservados**. 2006. 107 f. Dissertação. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M. et al. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.

NUNES, J. F.; RIERA, G. S.; SILVA, A. E. F. D. et al. **Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal**. Sobral: EMBRAPA/CNPCCaprinos, 1983. 11p. (Circular técnica, 6).

NUNES, J. F.; CIRÍACO, A. L. T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**, 2 ed, Gráfica LCR: Fortaleza, 1997, 199p.

NUNES, A. S. **Morfologia do funículo espermático e dos escrotos em caprinos nativos do estado do Piauí, com diferentes configurações escrotais**. Teresina, 2005, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

PARKS, J. E.; GRAHAN, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado**. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

ROBERTSHAW, D. Concepts in animal adaptation: thermoregulation of the goat. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson. **Proceedings...** Seoltsdale: Dairy goat journal, 1982, p. 395-397.

SALGUEIRO, C. C. de M.; NUNES, J. F.; MATEOS-REX, E. et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n.3, 2003.

SALVIANO, M. B.; CAVALCANTE, T. V.; SOUZA, J. A. T. Integrity of sperm DNA of native srd bucks agreed to scrotum conformation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION. 2006.

Proceedings... Belo Horizonte: CBRA, Minas Gerais, 2006. p.252.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. et al. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SILVA, A. E. D. F.; NUNES, J. F. **Comportamento sexual do macho caprino da raça Moxotó às variações estacionais no Nordeste do Brasil**. Sobral, EMBRAPA/CNPCaprinos, 1988. 17p. (Boletim técnico, 6).

SILVA, A. F. da; COSTA, E. P. da; OLIVEIRA, F. A. et al. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35; p. 452-456, 2006.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, J. M.; VIEIRA, R. J.; LIMA, V. F. H. de. Proporção de espermatozoides portadores de cromossomos X ou Y e concentrações séricas de testosterona em caprinos segundo a conformação escrotal. In: CONGRESSE NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 4, 2008, Imperatriz. **Anais...** Maranhão: CBRA, 2008. CD-ROM.

SODERQUIST, N.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ. Assessment of ram membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v. 48, p. 1115-1125, 1997.

SOUZA, F. F. de; LOPES, M. D.; BARRETO, C. S. Avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana de espermatozoides de cães, utilizando o teste hiposmótico e a coloração com sonda fluorescente. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 462-464, 2001.

THOMAS, C. A.; GANER, D. L.; DEJARNETE, J. M. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology and Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

VASQUEZ, J. M., MARTINEZ, E. A., MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to order for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p. 913-922, 1997.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J. M.; ALLEN, W. E. Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. **Journal of Reproductive and Fertility**, suplemento, p.651-653, 1987.

PAPAIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S. et al. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**. v. 48, p. 299-312, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ALBERTS, B. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999, 1294p.
- ALMEIDA, M. M. **Vascularização arterial testicular e escrotal de caprinos nativos do Estado do Piauí, segundo grau de divisão do escroto, e a relação com parâmetros reprodutivos**. 2003. 96 F. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7; p- 145-173, 1987.
- AMMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKinnon A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p 715-745.
- ARTIGA, C. G. Test de endosmosis en ovino. In: JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 7., 1994, Murcia. **Anais...** Ponencias y Cominucaciones, 1994, p. 77-81.
- ARRUDA, R. P. de. **Avaliação dos efeitos de diluidotes e crioprotetores para espermatozoides equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfologia (ASMA)**. 2000. 85f. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ARRUDA, R. P. de; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, suplemento, v. 31, p. 230-231, 2003.
- ASSUMPCÃO; M. E. O. D'AVILA; HAIPEÇK, K.; LIMA, A. S. et al. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilin Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 149-156, 2002.
- AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology** v. 10, p., 439-448, 1989.
- AZEVEDO, L. M.; VIEIRA, R. J.; SILVA, J. M.; et al. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen de caprinos. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2005, Teresina. **Anais...** Piauí: CBRA. 2005. CD-ROM.

*NBR 6023

- AZEVEDO, L. M.; VIEIRA, R. J.; SILVA, J. M.; et al. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen de caprinos. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2005, Teresina. **Anais...** Piauí: CBRA. 2005. CD-ROM.
- AZERÊDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; SANTOS, A. D. F. et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p.213-218, 2005.
- BRISOLA, L. B. de S.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D. et al. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etilenoglicol. **Ciência Rural**, v. 29, p.527-531, 1999.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Relação entre o espectrofotômetro e a câmara de Neubauer na determinação da concentração espermática. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UECE, 6., 1997, Fortaleza. **Anais...** Ceará. 1997. p. 284.
- CAVALCANTE, T. V. **concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos das raças boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva**. 2003. 77f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Veterinárias e Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- CAVALCANTE, T. V.; ESPER, C. R.; FERREIRA, J. L. et al. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelamento de caprinos das raças boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva. **Archives of Veterinary Science**, v.10, p. 89-93, 2005.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. 1998.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, 2007. Disponível em: <http://www.blackwellsynergy.com/loi/RDA>. Acesso em: 30 de janeiro de 2008.
- CEZAR, K. L. R.; GUERRA, M. M. P.; SANTOS, R. M. B. et al. A influência da configuração escrotal sobre a eficiência reprodutiva de caprinos nativos criados no

sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, p. 115-117, 2002.

CHAN, P. J.; CORSELLI, J. U.; JACOBSON, J. D.; et al. Correlation between intact sperm acrosome using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. **Archives of Andrology**, v. 36, p. 25-27, 1996.

CONNELL, M. O.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction** v. 17, p. 704-709, 2002.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1996. 673p.

CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42, p. 351-360, 1994.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. P. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-31, 1997.

CROSS, N. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.7-11, 1998.

EDDY, E. M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p.27-68.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p. 29-77

FELICIANO-SILVA, A. E. D.; NUNES, J. F.; MELO, F. A. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen e seus efeitos na fertilidade de caprinos. **A Hora Veterinária**, v.5, p. 66-69, 1986.

FELICIANO-SILVA, A. E. D.; NUNES, J. F. **Comportamento sexual do macho caprino da raça Moxotó às variações estacionais no Nordeste do Brasil**. Sobral: EMBRAPA/CNPC, 1998, 17P. (Boletim de Pesquisa, 6).

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; ROVAY, H. et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 436-457, 2001.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 139-144, 2005.

- GARCIA, A. R. O uso das sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 3. Belém. **Anais...** Pará: CBRA. 2006. CR-ROM.
- GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. et al. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v. 34; p. 127-138; 1986.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, Barueri: Manole, 7ed, 2004, p. 97-110.
- GENNIS R. B. **Biomembranes: molecular structure and function**. New York: Springer, 1989. 533p.
- GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino**. 2004. 92 f. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p. 55-64, 1990.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo: Manole, 1996. 582 p.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed., São Paulo: Manole, 2003. 530 p.
- HAMMERSTEDT, R. H; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p. 73-88, 1990.
- HARRISSON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.
- HOLT, W.V. The sperm plasma membrane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN SPERM ACROSSOME REACTION, PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL INDUCTION AND TRANSDUCTION PATHWAYS, 1995, France. **Proceedings...** France, 1995 .
- HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 19, p. 809-828, 1987.

JEYENDRAN, R.S.; VEN, H.H.V.; PELAEZ, M.P. et al. Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G.H. et al. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 44; p. 935-942, 1996.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic teste. **Theriogenology**, v. 39, p. 1279-1289, 1993.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-256, 1996.

LIMA JÚNIOR, A. D.; VIANNI, M. C. E. Efeito da morfologia da bolsa escrotal na termorregulação em caprinos nativos no Nordeste do Brasil. **Ciência da Vida**. v. 17, p. 97-107, 1995.

LIN, M.; MORSHEDI, M.; SRISOMBUT, C. et al. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of hypoosmotic swelling test, the water test, and cosin-Y staining. **Fertility and Sterility**, v. 70, p. 1148-1155, 1998.

LUKEFAHR, S. D.; HOHENBOKEN, W. Characteristics of spermatozoa midpiece length and its relationship with economically important traits incattle. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.508-512, 1981.

MACHADO JÚNIOR, A. A. N. **Influência da morfologia escrotal sobre a termorregulação, a biometria escroto-testicular e o comportamento sexual de caprinos nos períodos seco e chuvoso do Estado do Piauí**. 2005, 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; et al. Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2267-2276, 2004.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MEDINA, V.H. **Uso de sondas fluorescente na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos recém colhidos e submetidos a congelamento**. 1995. 89p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51; p.71-78, 1999.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p.757-763 2005.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4 ed., v. 1, Porto Alegre: Sulina, 1987. 364 p.

MOHANACHANDRAN NAIR, S. R.; KALATHARAN, J.; RAMAN, K. S. et al. Evaluation of canine frozen semen by hypoosmotic swelling test. **Indian Journal of Animal Science**, v. 68, p.1179-1180, 1998.

NASCIMENTO J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides equinos criopreservados**. 2006. 107 f. Dissertação. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M. et al. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.

NUNES, J. F.; RIERA, G. S.; SILVA, A. E. F. D. et al. **Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal**. Sobral: EMBRAPA/CNPCaprinos, 1983. 11p. (Circular técnica, 6).

NUNES, J. F.; CIRÍACO, A. L. T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**, 2 ed, Gráfica LCR: Fortaleza, 1997, 199p.

NUNES, A. S. **Morfologia do funículo espermático e dos escrotos em caprinos nativos do estado do Piauí, com diferentes configurações escrotais**. Teresina, 2005, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies of fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122; p. 105-151, 1990.

PAPAIIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S. et al. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**. v. 48, p. 299-312, 1997.

PARKS, J. E.; GRAHAN, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PENÃ, A. **Supervivencia y Fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación**, , 1997. 329 f. Tesis – Facultad de Veterinária, Universidad de Santiago de Compostela, Espana.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino**

refrigerado. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

ROBERTSHAW, D. Concepts in animal adaptation: thermoregulation of the goat. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson. **Proceedings...** Seoltsdale: Dairy goat journal, 1982, p. 395-397.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L. E. et al. Hypoosmotic swelling (HOST) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.

SALGUEIRO, C. C. de M.; NUNES, J. F.; MATEOS-REX, E. et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, 2003.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. et al. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SALVIANO, M. B.; CAVALCANTE, T. V.; SOUZA, J. A. T. Integrity of sperm DNA of native srd bucks agreed to scrotum conformation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION. 2006. **Proceedings...**Belo Horizonte:CBRA, Minas Gerais, 2006. p.252.

SEAGER, S. W. J.; FLETCHER, W. S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Laboratory of Animal Science**, v. 22, p. 177-182, 1972.

SEKI, N., TOYAMA, Y., NAGANO, T Changes in the distribution of filipinsterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. **The Anatomical Record**, v.232, p.221-30, 1992.

SILVA, A. E. D. F.; NUNES, J. F. **Comportamento sexual do macho caprino da raça Moxotó às variações estacionais no Nordeste do Brasil**. Sobral, EMBRAPA/CNPCaprinos, 1988. 17p. (Boletim técnico, 6).

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C.e. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freez et alng process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-29, 2003.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, A. F. da; COSTA, E. P. da; OLIVEIRA, F. A. et al. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35; p. 452-456, 2006.

SILVA, J. M.; VIEIRA, R. J.; LIMA, V. F. H. de. Proporção de espermatozoides portadores de cromossomos X ou Y e concentrações séricas de testosterona em caprinos segundo a conformação escrotal. In: CONGRESSE NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 4, 2008, Imperatriz. **Anais...** Maranhão: CBRA, 2008. CD-ROM.

SINGER, S. J., NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-31, 1972.

SODERQUIST, N.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ. Assessment of ram membrane integrity following different thawing procedures. **Theriogenology**, v. 48, p. 1115-1125, 1997.

SORRIBAS, C. E. **Reproduccion em los animales pequeños**. Buenos Aires: Intermédica, 1995, 152 p.

SOUZA, F. F. de; LOPES, M. D.; BARRETO, C. S. Avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana de espermatozoides de cães, utilizando o teste hiposmótico e a coloração com sonda fluorescente. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 462-464, 2001.

SOUZA, F. F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

THOMAS, C. A.; GANER, D. L.; DEJARNETE, J. M. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology and Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

VASQUEZ, J. M., MARTINEZ, E. A., MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to order for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p. 913-922, 1997.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes In: MORRIS, E. J.; CLARK, A. (Eds). **The effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p.189-218.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J. M.; ALLEN, W. E. Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. **Journal of Reproductive and Fertility**, suplemento, p.651-653, 1987.

WATSON, P.F. Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their postthawing

function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.871-91, 1995.

WHITFIELD, C. H.; PARKINSON, T. J. Assessment of the fertilizing potencial of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology**, v.44, p.413-422, 1995.

WOLFE, C. A.; JAMES, P. S.; MACKIE, A. R. et al. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59; p. 1506-1514, 1998.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Botucatu, 1998. 118p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press: New York, p. 189-317, 1994.

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.822, p.267-87, 1985.

APÊNDICE

1 Composição do Diluidor

A. TRIS concentrado

TRIS (hidroximetilaminometano)***	12,11g
Ácido cítrico***	6,8g
Frutose***	2,5g
Lactose***	2,5g
Água destilada	q.s.p. 68,mL
Clicerina***	q.s.p. 100mL
Garamicina (1:10.000)	0,7mL

Corrigir o pH para 6,8

B. TRIS uso imediato

Solução A	10mL
Água destilada	30,mL
Gema de ovo	10mL

2 Composição da Solução hiposmótica (150 mOsm/L)

A. Solução 1 a 300 mOsm/L

Citrato trissódico***	1,47g
Frutose***	2,7g

Diluir o citrato em 50mL de água tri-destilada deionizada. Com esta solução diluir a frutose. Acrescente água até atingir o volume de 100mL.

B. Solução 2 a 150 mOsm/L

Solução 1	25mL
Água destilada	q.s.p 50mL

Aferir a osmolaridade em osmômetro

3 Composição das soluções para avaliação da membrana plasmática espermática sob microscopia de fluorescência

A. Solução estoque salina

Componentes	g/100mL
NaCl*	0,8183
Glicose***	0,0186
KCl*	0,1799
Álcool polivinílico**	0,0500
Polivinilpirrolidona***	0,0500
HEPES (3375)**	0,2383
HEPES (7006)** sal de sódio	0,2603

O pH ajustado para 7,55 com NaOH* a 1N e a solução estocada a 4°C por três meses.

B. Solução de formaldeído

Formaldeído a 37%*	0,0250g
Água destilada	10mL

Preparada imediatamente antes de cada experimento.

C. Solução estoque de Iodeto de Propídio

Iodeto de Propídio**	0,0005g
Solução salina isotônica	1mL

D. Solução estoque de Diacetato de Carboxifluoresceína

Diacetato de Carboxifluoresceína**	0,0005g
Dimetilsulfóxido*	1mL

Ambas as soluções (itens C e D) foram estocadas a -20°C, em local escuro, por tempo indeterminado.

E. Solução Corante (meio de coloração)

Solução estoque de Iodeto de Propídio	10µL
Solução estoque de Diacetato de Carboxifluoresceína	20µL
Solução de Formaldeído	20µL
Solução estoque salina	1mL

A solução corante foi preparada, no máximo, 1 hora antes do uso.

*MERCK, Rio de Janeiro – Brasil.

**SIGMA, Chemical Co.,MO, USA.

***VETEC, Rio de Janeiro – Brasil.