

CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO

**AVALIAÇÃO “IN VITRO” DO SÊMEN CAPRINO RESFRIADO
A 5°C EM FUNÇÃO DE CURVAS DE RESFRIAMENTO
E DILUIDORES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B622a
2005

Bispo, Charles André Souza, 1976-
Avaliação "in vitro" do sêmen caprino resfriado
a 5° C em função de curvas de resfriamento e diluidores
/ Charles André Souza Bispo. – Viçosa : UFV, 2005.
xvi, 61f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 38-45.

1. Caprino - Reprodução. 2. Sêmen - Resfriamento.
3. Sêmen - Análise. 4. Criopreservação de órgãos,
tecidos, etc. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22.ed. 636.39082

CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO

**AVALIAÇÃO “IN VITRO” DO SÊMEN CAPRINO RESFRIADO
A 5°C EM FUNÇÃO DE CURVAS DE RESFRIAMENTO
E DILUIDORES**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

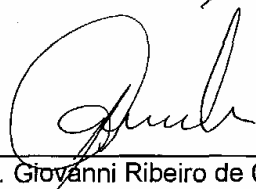
Aprovada: 1º de agosto de 2005.


Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Conselheiro)


Dr. Cláudio José Borela Espescht


Profª Théa Mirian Medeiros Machado


Dr. José Reinaldo Mendes Ruas


Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

Senhor, tu me sondas e me conheces¹. Os teus olhos me viram à substância ainda informe, e no teu livro foram escritos todos os meus dias, cada um deles escrito e determinado quando nem um deles havia ainda¹⁶.

Salmo 139: 1,16.

Deus, somente Deus, criou o mundo e o que nele há,
o ser que pode respirar existe pra mostrar a glória do Senhor.

Deus, somente Deus, os seus mistérios pode revelar,
os seus desígnios quem jamais um dia conheceu, pois Deus, somente é Deus.

Deus, somente Deus, domina o trono do universo, que a voz da criação se erga para dar louvor somente a Deus.

Deus, somente Deus, eternamente em nós a de inspirar, a alegria de adorar,
desejo de exaltar a Deus, somente a Deus.

Vencedores por Cristo

A Deus, meu Senhor.

Aos meus pais, Manoel Bispo dos Anjos
(*in memoriam*) e Valdeci Souza Bispo.

Aos meus irmãos, José Ronaldo, Paulo
Roberto, Maria Rosicley e Manoel
Júnior, pelo apoio incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar mais esta oportunidade e pelo cuidado dispensado a mim em todos os dias da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

À minha mãe, Valdeci Souza Bispo, pelas orações, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação e pela força para que eu concluísse mais esta etapa de minha vida profissional.

Aos meus irmãos, José Ronaldo, Paulo Roberto, Maria Rosicley e Manoel Júnior, pela dedicação, pelo amor, pelos exemplos, e por serem também, cada um, meus pais.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas, pelo carinho e pela amizade dispensados ao tio Charles.

Aos meus familiares, pela torcida e pelas orações.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela orientação, amizade e confiança.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pelas lições de vida.

Ao professor José Domingos Guimarães, pelas dicas, pelo convívio e pela amizade.

Ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela concessão do capril e pela confiança na realização deste trabalho.

Ao amigo e conselheiro Rogério Fürst, pelo convívio, pela dedicação, amizade e confiança.

Ao amigo Belmiro Zanpeline, pela amizade, consideração e confiança.

Ao amigo Paulo Moreira, por torcer pelo meu sucesso, pela amizade e consideração.

A todos da Igreja Presbiteriana de Viçosa, pelas orações, pela amizade e pelo cuidado.

Aos amigos e irmãos em Cristo da ABU - Pós, pelo companheirismo, pela amizade, pelo cuidado e pelas orações.

Aos amigos e companheiros de luta, Adolfo Lima Neto, Pedro Leite, Renner Maia, Flávio Lopes e Vinício Nascimento.

Ao meu amigo Alisson Sanguinet, pelo convívio, pela amizade e confiança.

Aos amigos de república, Rodrigo, Antônio e Rafael, pela amizade.

Aos colegas de Pós-Graduação, Reno Roldi, Miller Palhão, Herbert Rovay, e Luiz Gustavo, pelo apoio, pelo companheirismo, pela amizade e pelos bons momentos vividos juntos.

Às amigas Karine Meireles e Eunice Rodrigues, pela agradável convivência.

À Celeste, secretária da Coordenação da Pós-graduação do Departamento de Zootecnia, pela paciência e dedicação.

À professora Maria Madalena Pessoa Guerra (UFRPE), por despertar em mim o interesse pela pesquisa científica.

Ao professor Marc Henry (UFMG), por ter confiado em mim e pelo apoio no início da minha vida científica.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO, filho de Manoel Bispo dos Anjos (*in memoriam*) e Valdeci Souza Bispo, nasceu em Juazeiro, no Estado da Bahia, em 14 de julho de 1976.

Em agosto de 1996, iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife-PE, graduando-se em 1^o de fevereiro de 2002.

Em 2 de abril de 2002, iniciou o curso de Aperfeiçoamento Profissional pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), concluindo-o em 27 de julho de 2003.

Em agosto de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, na área de reprodução animal, submetendo-se à defesa de tese em 1^o de agosto de 2005.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Sêmen resfriado	4
2.2. Curvas de resfriamento	6
2.3. Diluentes de sêmen	9
2.3.1. Diluentes à base de gema-de-ovo	10
2.3.2. Diluentes à base de leite desnatado	12
2.4. Testes de avaliação da integridade da membrana.....	14
2.4.1. Teste hiposmótico	15
2.4.1. Coloração supravital (eosina-nigrosina)	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Local.....	19
3.2. Animais e alimentação	19
3.3. Coleta do sêmen.....	20
3.4. Análises do sêmen.....	20

	Página
3.5. Delineamento experimental	22
3.6. Diluição do sêmen	22
3.7. Resfriamento do sêmen.....	23
3.8. Análise do sêmen resfriado.....	25
3.9. Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Sêmen fresco.....	27
4.2. Sêmen resfriado	28
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÊNDICES	46
APÊNDICE A	47
APÊNDICE B	59

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Médias e desvios-padrão de motilidade, vigor, morfológicas, teste hiposmótico e coloração supravital do sêmen fresco	28
2 Dados de avaliações seminais pós-resfriamento de acordo com o tempo de armazenamento	29
1A Dados de avaliações seminais pós-resfriamento de acordo com o tempo de armazenamento	47
2A Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática	47
3A Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática	48
4A Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática	48
5A Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática	49

6A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática	49
7A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 8 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático	50
8A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático	50
9A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático	51
10A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático	51
11A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático	52
12A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático	52
13A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 8 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados	53
14A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados	53
15A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados	54
16A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados	54

	Página	
17A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados	55
18A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados	55
19A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 8 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico	56
20A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico	56
21A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico	57
22A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico	57
23A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico	58
24A	Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico	58
1B	Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozóides corados após 8 horas de armazenamento a 5°C.....	59
2B	Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozóides corados após 16 horas de armazenamento a 5°C.....	59

	Página
3B Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozoides corados após 24 horas de armazenamento a 5°C.....	60
4B Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozoides corados após 40 horas de armazenamento a 5°C.....	60
5B Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozoides corados após 48 horas de armazenamento a 5°C.....	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Reação hiposmótica quando os espermatozoides são submetidos ao teste hiposmótico. (A = indica espermatozoide lesado, enquanto B, C, D, E, F e G indicam espermatozoides íntegros) (Fonte: SAMPER e MORRIS, 1998)	21
2 Equitainer®, sistema passivo de resfriamento de sêmen, utilizado para a realização da CR1	24
3 Aparato plástico utilizado para a realização da CR2, segundo a metodologia de FÜRST (2002)	24
4 Curva de resfriamento (CR2) realizada na geladeira, em função do tempo de acordo com FÜRST (2002)	25
5 Motilidade do sêmen resfriado de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.....	31
6 Vigor do sêmen resfriado de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.....	31
7 Vigor do sêmen resfriado de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.....	34
8 Valores percentuais de reação ao teste hiposmótico de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.....	35

RESUMO

BISPO, Charles André Souza, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2005. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Conselheiros: Ciro Alexandre Alves Torres e José Domingos Guimarães.

O experimento foi conduzido no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com o objetivo de avaliar o efeito da curva de resfriamento em função do diluente utilizado na conservação do sêmen caprino armazenado a 5°C. Foram utilizados quatro reprodutores caprinos adultos das raças Parda Alpina e Saanen, sendo dois de cada raça. O sêmen foi coletado pelo método da vagina artificial. O ejaculado foi dividido em duas partes iguais, e cada uma das partes foi diluída com um dos respectivos diluentes. Foram utilizados os seguintes diluentes: um à base de leite desnatado e outro à base de gema-de-ovo (citrato-gema). Após o envase em palhetas francesas de 0,25 mL, as amostras foram submetidas a duas curvas de resfriamento, sendo uma com taxa de resfriamento de -0,033°C/minuto e a outra com -0,5°C/minuto, até alcançar a temperatura de 5°C, e analisadas a cada 8 horas, durante um período de 48 horas. A eficiência na preservação celular teve influência direta das curvas de resfriamento, quando associadas aos diluentes utilizados. O diluente citrato-

gema, quando utilizado em conjunto com as curvas lenta (CR 1) ou rápida (CR 2), foi o que melhor preservou as células espermáticas ao longo do tempo de armazenamento. O diluente leite desnatado obteve melhor taxa de preservação das células, quando associado à curva de resfriamento rápida (CR 2). A taxa de resfriamento de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (CR 2) proporcionou melhor manutenção da viabilidade espermática, quando o sêmen foi armazenado a 5°C , durante 48 horas.

ABSTRACT

BISPO, Charles André Souza, MS., Universidade Federal de Viçosa, August 2005. **Effect of different cooling rates and diluents in the conservation of goat sperm stored at 5°C.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Committee Members: Ciro Alexandre Alves Torres and José Domingos Guimarães.

The aim of this study was to evaluate the effect of different cooling rates and diluents in the conservation of goat sperm viability stored at 5°C during 48 hours. The semen of two Saanen and Alpine goats were collected by an artificial vagina and then assigned into four treatments. Treatment 1 (T1): Egg-yolk diluent (YOD) + Low cooling rate (LCR; -0.33°C / minute); T2: Egg-yolk diluent + high cooling rate (HCR; -0.05°C / minute); T3: Skimmilk Diluent (SMD) + LCR; T4, Skimmilk Diluent (SMD) + HCR. The semen was stored at 5°C and evaluated at each 8 hours until it complete 48 hours of conservation. There was effect of the two diluents and cooling rates on the conservation of the goat spermatozoa. The YOD had better conservation of the sperm integrity than the SMD. The SMD had a superior preservation when cooled in a high cooling hate. The higher cooling hate (-0.5°C/minuto) promotes a better conservation of the goat sperm viability at 5°C and during 48 hours after collected.

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura brasileira vem passando por constantes mudanças. Apesar de a Região Nordeste se destacar pelo desenvolvimento da produção de caprinos, pois é onde se encontra a quase totalidade do rebanho nacional (93%), principalmente nos Estados da Bahia e Pernambuco (IBGE, 2004), em outras regiões o número de criatórios tem aumentado, devido à produtividade de carne ou leite obtida com esses animais. Além disso, a pequena oferta de produtos oriundos dessa espécie e a crescente demanda têm encorajado muitos pecuaristas a diversificarem suas atividades por meio da caprinocultura.

A exploração de pequenos ruminantes domésticos teve um aumento significativo nos últimos anos, por ser uma alternativa viável no setor primário da economia, particularmente em regiões onde as adversidades climáticas, o solo e a vegetação impõem restrições à exploração de outras espécies animais.

Segundo BETINI et al. (1998), a inseminação artificial (I.A.) é uma biotécnica de reprodução animal que visa o uso intensivo de reprodutores portadores de genes desejáveis. Ela é uma poderosa ferramenta da genética populacional, responsável pela elevação da produtividade, por meio da seleção de reprodutores geneticamente superiores, que usados como doadores de sêmen vêm acelerando o ganho genético na população caprina (SOLANO et al., 1999). A I.A. é um ato realizado pelo homem, que tem por finalidade a introdução do sêmen nas vias genitais da fêmea caprina (TRALDI, 1994),

in natura, diluído, resfriado ou congelado-descongelado por meio de instrumentos (GONZALES et al., 2002), em condições que permitam que os espermatozoides encontrem o óvulo e o fecunde (TRALDI, 1994). O sêmen quando devidamente processado, diluído e conservado pode, de uma só coleta, servir para a inseminação de dezenas de cabras (MIES FILHO, 1987).

Devido à estacionalidade reprodutiva que ocorre nessa espécie em algumas regiões do Brasil, nem sempre é possível obter bons resultados na distribuição de parições ao longo do ano, utilizando-se o cio natural. Sendo assim, os criadores podem recorrer à sincronização artificial do estro, por meio da sua indução com o auxílio da hormonoterapia (MEDEIROS et al., 1994), uma vez que a I.A. pode ser programada e realizada em um grande número de fêmeas em período predeterminado, resultando na concentração da época de parição das fêmeas, o que possibilita a melhor programação da oferta de produtos ao mercado consumidor (GONÇALVES et al., 2001).

O sêmen caprino pode ser conservado sob refrigeração a 4°C, podendo ser utilizado em um curto espaço de tempo, ou ainda congelado a -196°C em nitrogênio líquido, o que possibilita a sua utilização por um longo período de tempo. O sêmen dessa espécie possui uma particularidade com relação ao congelamento devido a problemas gerados pela interação do plasma seminal com os fosfolipídios existentes nos diluentes, comumente utilizados para beneficiamento e criopreservação do material genético (Nunes et al., 1982, citados por GONZALES et al., 2002). O sêmen resfriado apresenta a vantagem de ser estocado por um período de três a quatro dias, sem que as taxas de gestação sejam prejudicadas, nem pela máxima utilização dos bodes (quando o reprodutor é utilizado por vezes consecutivas, a concentração espermática dos ejaculados subseqüentes geralmente encontra-se diminuída), nem pelo uso de sêmen congelado, que sofre mais danos celulares devido ao processo de congelamento (WATSON, 1981).

O conhecimento da fisiologia celular veio contribuir com o desenvolvimento das técnicas de manipulação espermática, uma vez que todos os procedimentos realizados na conservação dessas células são baseados nesses conhecimentos (AMANN e PICKETT, 1987; HOLT, 2000). Entre os procedimentos empregados para obter a melhor viabilidade espermática, que resulte em melhores índices de fertilidade, pode-se citar a taxa de resfriamento

empregada quando o sêmen é resfriado a 37°C, até alcançar 4°C. De acordo com a taxa de resfriamento imposta à célula, poderão ou não ocorrer danos que venham reduzir a capacidade de fertilização do ovócito por parte dos espermatozoides (STRYER, 1988).

Em associação a esses procedimentos, o diluente utilizado na conservação dos espermatozoides tem fundamental importância, pois ele deverá conter substâncias que ao mesmo tempo proporcionem aporte nutricional e proteção às células que nele estão diluídas (PICKETT e AMANN, 1987).

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da curva de resfriamento em função do diluente utilizado no armazenamento do sêmen caprino a 5°C, durante 48 horas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sêmen resfriado

A inseminação artificial (I.A.) em caprinos é praticada em muitos países. No entanto, seu uso se restringe a poucos rebanhos, e por isto não é amplamente utilizada. Um dos principais problemas mundiais que reduzem o uso da I.A. nessa espécie se deve aos processos de conservação espermática, que favorecem a redução da viabilidade das células, pois quando a fêmea é inseminada pela deposição do sêmen na cérvix a quantidade de espermatozóides que transpõem as pregas cervicais é baixa, resultando em índices de fertilidade insatisfatórios (RITAR, 1993).

O sêmen caprino pode ser resfriado em temperaturas entre 5 e 2°C, sendo de 5 a 4°C as mais comumente utilizadas (LEBOEUF et al., 2000).

MIES FILHO (1987) relatou que o frio é o agente mais eficaz na promoção da diminuição das atividades metabólicas dos espermatozóides, podendo o sêmen ser conservado em estado líquido por várias horas e com taxas de fertilidade aceitáveis. ROCA et al. (1997) observaram taxas de prenhez com sêmen resfriado e armazenado a 5°C de 73,1 e de 74,3%, quando as cabras foram inseminadas por meio da deposição do sêmen na cérvix e no interior do útero, respectivamente.

LEBOEUF et al. (2000) utilizaram partidas de sêmen mantidas resfriadas a 5°C por até 8 dias, e obtiveram um percentual de cabras prenhas 50 dias

após a inseminação artificial, por via transcervical, de 64, 36 e 6% para 2, 4 e 8 dias de armazenamento, respectivamente.

Entre as principais vantagens do resfriamento, está a manutenção da viabilidade espermática por mais tempo, sem que ocorra diminuição na capacidade fertilizante dos espermatozoides. Um outro fator positivo é a possibilidade de diminuir o estresse imposto aos reprodutores por ocasião do número sucessivo de cópulas diárias, durante uma estação reprodutiva, sob pena de prejudicar os índices reprodutivos do rebanho e, conseqüentemente, onerar o sistema de produção, pois muitas vezes precisa-se aumentar o número de reprodutores presentes no capril.

A temperatura do sêmen no momento da ejaculação é de aproximadamente 37,5°C. A exposição do sêmen a temperaturas superiores a essa aumenta o ritmo metabólico e esgota suas reservas energéticas, ocorrendo decréscimo da viabilidade média do espermatozoide. Por outro lado, a diminuição da temperatura contribui para a redução do metabolismo espermático, porém a diminuição dessa temperatura de forma abrupta produzirá a perda da viabilidade celular (WATSON, 1981).

Os produtos do metabolismo como o ácido láctico e, ou, gás carbônico podem aumentar a acidez do sêmen, desencadeando danos celulares irreversíveis (McKINNON, 1996). A peroxidação dos lipídios da membrana leva à perda de sua integridade, o que prejudica a função celular e, conseqüentemente, diminui a motilidade do espermatozoide (AURICH et al., 1996). Quando os espermatozoides são armazenados a 5°C, as necessidades metabólicas decrescem a aproximadamente 10% daquela que teriam se estivessem à temperatura de 37°C. Em conseqüência, a produção de catabólitos será menor e a peroxidação da membrana plasmática será mais lenta, de modo que o desgaste da célula não ocorra de forma tão rápida (McKINNON, 1996).

Para o sucesso na preservação dos espermatozoides pelo resfriamento, é necessário seguir uma série de passos que visam a redução nos danos causados às células e que assegurem longevidade *in vitro* e *in vivo*, a saber: taxa da diluição adequada, diluentes, substâncias protetoras, taxas adequadas de resfriamento (FASTAD, 1996) e manutenção em temperaturas específicas que reduzam o metabolismo, minimizem os danos na membrana e não

desencadeiem prematuramente a capacitação e a reação acrossômica (LOOMIS, 1992).

Alguns trabalhos foram realizados em eqüinos, a fim de determinar as melhores temperaturas de armazenamento do sêmen resfriado. VERNER et al. (1989) demonstraram que a estocagem de espermatozóides a 5°C foi superior à realizada a 20°C e que as temperaturas entre 4 e 6°C apresentaram resultados superiores aos do sêmen armazenado entre 0 e 2°C na manutenção da viabilidade espermática na espécie estudada. No entanto, MAGISTRINE et al. (1992) demonstraram que a temperatura de estocagem e manutenção seminal depende da composição do diluente. Os autores observaram melhores taxas de motilidade espermática de garanhões quando o espermatozóide foi submetido a temperaturas de 15°C, devendo ser ressaltado que o diluente utilizado não continha leite em sua composição.

2.2. Curvas de resfriamento

A membrana celular é composta por proteínas e lipídios. Os lipídios estão organizados de forma bilaminar, onde a porção hidrofílica está direcionada para o exterior e a hidrofóbica está voltada para a face interna da membrana. Essa disposição confere à célula uma barreira hidrofóbica, pela qual a água e as moléculas nela dissolvidas são impedidas de transpor a membrana plasmática. As proteínas permitem a formação de canais hidrofílicos intercalados à barreira hidrofóbica, pois são nesses locais que a água e as moléculas que nela estão dissolvidas conseguem transpor a membrana e, assim, proporcionar trocas entre os meios interno e externo da célula (AMANN e GRAHAM, 1993).

Atualmente o conhecimento obtido sobre as membranas plasmáticas está baseado no modelo do mosaico fluido proposto por SINGER e NICOLSON (1972), na qual os lipídios estão livres, movimentando-se lateralmente e, portanto, proporcionando fluidez à membrana.

Em temperatura de 37°C, os lipídios encontram-se em estado fluido e dispostos de forma aleatória. Quando há diminuição da temperatura do meio em que essas células estão contidas, ocorre um alongamento das cadeias de

ácidos graxos, resultando no aumento da sua rigidez. Ocorre então que os fosfolipídios semelhantes tendem a se agrupar, dando origem a estruturas cristalinas de forma hexagonal, e somente uma porção pequena destes fosfolipídios mantém-se na forma líquida. Esse arranjo irá favorecer o deslocamento das proteínas para esses locais, as quais se fundem e, conseqüentemente, formam agregados protéicos que resultam em aumento da permeabilidade da membrana e na diminuição do metabolismo celular (AMANN e PICKETT, 1987; STRYER, 1988; AMANN e GRAHAM, 1993).

A esses danos, previamente descritos, denomina-se choque térmico. O termo refere-se às mudanças que ocorrem quando os espermatozóides passam de temperatura corpórea (37°C) até 0°C de forma rápida, ou seja, a queda de temperatura é muito rápida (JASKO, 1994). Os danos sofridos pelas células espermáticas são irreversíveis, sendo caracterizados por movimento anormal, ou seja, ocorre comprometimento do padrão de motilidade progressiva, assim como sua perda, danos ao acrossoma e à membrana plasmática; aumento da permeabilidade celular; redução do metabolismo; e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

Os danos aos espermatozóides podem ser classificados de duas formas: a) injúrias diretas do resfriamento e b) injúrias indiretas ou latentes. As injúrias diretas resultam em alterações da membrana plasmática e subseqüentes danos bioquímicos e metabólicos, que são imediatamente evidenciados pelas alterações de motilidade do espermatozóide ou por meio de testes bioquímicos. Os danos latentes são aqueles detectados somente horas ou dias após as células serem submetidas ao processo de resfriamento e armazenamento entre 0 e 5°C (VERNER et al., 1988).

Essas mudanças de conformação da membrana acontecem durante a fase de transição, quando se configura a passagem do estado líquido para o estado cristalino da membrana plasmática. A intensidade e a sensibilidade ao choque térmico variam de acordo com a espécie, com o grau de maturação do espermatozóide e com a quantidade de plasma seminal, e pode ser determinada pelo conteúdo de colesterol da membrana e pelo grau de saturação dos ácidos graxos, os quais influenciam a fluidez da membrana plasmática (WATSON, 1981). De acordo com o autor, espécies com maior proporção de colesterol:fosfolipídios distribuídos na membrana, como no touro,

e maior proporção de ácidos graxos saturados:não-saturados são mais resistentes às mudanças bruscas de temperatura.

Em consequência da desestabilização das membranas pelo resfriamento, ocorrem a reação acrossômica e a capacitação desordenada. As membranas sofrem mudanças na fluidez semelhantes às ocorridas durante a capacitação, ou seja, tornam-se permeáveis aos íons cálcio, que são necessários para o processo de capacitação e reação acrossômica (WATSON, 1995).

Os danos causados pelo choque térmico podem ser minimizados quando as células espermáticas de eqüinos são submetidas a taxas de resfriamento lentas, na faixa de temperatura entre 20 e 4°C (PICKET e AMANN, 1993).

MORAN et al. (1992), estudando as faixas de temperatura que induzem choque térmico em espermatozóides eqüinos, concluíram que as temperaturas entre 19 e 8°C são as que tornam as células mais suscetíveis aos danos celulares e que com o resfriamento rápido (-0,7°C/minuto) de 37 a 19°C não ocorre choque térmico. No entanto, durante a fase de sensibilidade ao choque térmico os autores recomendam a queda de temperatura com taxas de -0,05°C/minuto. Quando atingida a temperatura de 8°C, a queda da temperatura poderá ser mais rápida, sem prejuízos para as células. Neste protocolo, os autores relatam que o tempo de curva percorrido dos 37 até 4°C foi de quatro horas.

KAYSER et al. (1992) avaliaram curvas de resfriamento com a intenção de minimizar os danos às células espermáticas de garanhões e concluíram que os espermatozóides dessa espécie podem ser rapidamente resfriados dos 37 aos 20°C, mas recomendam que dos 20 aos 5°C o resfriamento seja realizado de forma lenta, com taxas não superiores a -0,1°C/minuto e preferencialmente a -0,05°C/minuto, onde a manutenção da sobrevivência espermática a 5°C é maximizada.

MACHADO e SIMPLÍCIO (1995) relataram que para o sêmen caprino o ritmo de refrigeração deve estar entre -0,25 e -0,35°C/minuto, até que seja atingida a temperatura de 5°C.

FÜRST (2002) obtiveram êxito no resfriamento do sêmen eqüino na faixa de 18 a 8°C, utilizando taxas de resfriamento médias de -0,5°C/minuto e

-0,3°C/minuto, onde os danos à membrana espermática foram reduzidos, o que foi constatado pelo teste hiposmótico e pela coloração supravital (eosina-nigrosina).

DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) estudaram, para sêmen eqüino, taxas de resfriamento rápida (acima de -1°C/minuto), média (entre -1°C/minuto e -0,33°C/minuto) e lenta (menores que -0,33°C/minuto), e concluíram que as taxas lenta e rápida causam maiores danos, ou seja, maior número de patologias, menor motilidade e maior número de células mortas após o resfriamento. De acordo com JASKO et al. (1991), as curvas de resfriamento lentas são necessárias apenas durante a faixa de temperatura na qual o espermatozóide é mais suscetível ao choque térmico. Dentro deste contexto, McKINNON (1996) relatou que com espermatozóides de garanhão em diluentes à base de leite verificou-se que entre 37 e 19°C o resfriamento pode ser rápido (-0,7°C/minuto), sem que apresente prejuízos à motilidade espermática. Por outro lado, entre 19 e 8°C o resfriamento lento (-0,05°C/minuto) pode evitar a perda da motilidade.

Associadas a essas taxas, algumas substâncias que promovem a redução desses danos também são utilizadas, como é o caso da gema-de-ovo e do leite desnatado (PICKET e AMANN, 1993).

2.3. Diluentes de sêmen

Algumas soluções ou substâncias têm sido usadas como diluentes do sêmen caprino resfriado. Nesta modalidade de armazenamento, a modificação mais utilizada em relação aos diluentes de congelamento é a ausência do crioprotetor.

Lipídios, proteínas e macromoléculas são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de conservação, sem que para isso necessitem penetrar nos espermatozóides, são eles: a gema-de-ovo, o leite e alguns açúcares (KEITH, 1998).

Segundo PICKETT e AMANN (1987), um diluente apropriado à conservação seminal, em geral, deve apresentar as seguintes características: pressão osmótica compatível, balanço mineral apropriado, combinação

ajustada de nutrientes, capacidade de neutralizar produtos tóxicos originados do metabolismo espermático, proteção contra os danos causados por ação das mudanças de temperatura, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática.

Dentre as substâncias utilizadas na diluição do sêmen caprino, LEBOEUF et al. (2000) citam a solução salina, o citrato de sódio-gema, a frutose-gema, a sacarose-EDTA, o CaNa₂-gema, o leite-gema (seja o leite *in natura*, desnatado ou reconstituído) e o CUE (Cornell University Extender). No Brasil, na maioria dos diluentes são utilizados a gema-de-ovo e o leite desnatado como base desses meios.

2.3.1. Diluentes à base de gema-de-ovo

A gema-de-ovo é um dos constituintes mais utilizados como base dos diluentes de sêmen dos animais domésticos. Depois que PHILLIPS e LARDY (1940) relataram que a gema-de-ovo era benéfica à preservação de espermatozóides submetidos ao frio, esta foi incorporada de forma habitual na maioria dos protocolos de conservação seminal, seja para o sêmen de animais domésticos, como também para o uso no sêmen de muitas espécies exóticas. A gema-de-ovo protege contra o choque pelo frio (WATSON, 1981; DROBNIS et al., 1993), devido à presença das frações lipoprotéicas de baixa densidade na sua composição. Essa proteção se deve à presença de fosfolipídios, que agem na superfície celular, restaurando a perda de fosfolipídios que ocorre durante o choque térmico e prevenindo, conseqüentemente, a ruptura da membrana celular (FASTAD, 1996). WATSON (1995) destacou, além da proteção da gema-de-ovo aos espermatozóides, que essa ação não é efetiva em todas as espécies. No entanto, a interação de lipossomos com a superfície celular e as reações pelas quais conferem proteção contra as injúrias causadas pela ação do frio não são ainda conhecidas em sua totalidade (QUINN et al., 1980).

O uso da fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bodes e touros contra o choque térmico. Os lipossomos que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem os espermatozóides de

bovinos e garanhões dos danos do processo de congelamento, possivelmente por prevenir as alterações deletérias do processo de resfriamento (WILHEM et al., 1996).

A prevenção conferida pelos lipídios com relação ao choque térmico parece estar ligada à quelação dos íons cálcio do meio, evitando sua entrada no espermatozóide (WILHEM et al., 1996).

Apesar dos benefícios que foram evidenciados sobre a utilização da gema-de-ovo em diluentes de sêmen, alguns autores sugerem o seu uso diferenciado quando o sêmen é proveniente da espécie caprina.

ROY (1957) afirmou que diluentes que contêm gema-de-ovo em sua composição não são recomendados para a utilização em sêmen caprino. Tal evidência deve-se ao fato de o plasma seminal caprino conter uma enzima secretada pelas glândulas bulbouretrais, que quando em presença da gema-de-ovo, por hidrólise, leva à formação de lisolecitinas, substâncias estas tóxicas para a célula espermática.

IRITANI e NISCHIKAWA (1961a) identificaram essa enzima como sendo uma fosfolipase A, que catalisa a hidrólise das lecitinas da gema-de-ovo em ácidos graxos e lisolecitinas.

A toxicidade da enzima coaguladora da gema-de-ovo difere com a quantidade de hidrolizantes, que varia com o pH, a temperatura, a concentração de plasma seminal, a estação do ano que é produzido o ejaculado e a raça da galinha que produziu a gema. Quando ejaculados de bodes foram lavados anteriormente à diluição, a sobrevivência espermática após a estocagem a 4°C foi melhor que a dos espermatozoides não-lavados (ROY, 1957; IRITANI et al., 1961b). Os autores também relataram que a atividade dessa enzima é destruída pelo aquecimento até 60°C, por um tempo de 2 a 5 minutos.

Como alternativa, CORTEL (1974) sugeriu remover o plasma seminal por meio da lavagem dos espermatozoides imediatamente após a coleta, pois houve incremento da motilidade espermática e do porcentual de células vivas durante a estocagem quando foram utilizados diluentes à base de gema-de-ovo. Para a retirada do plasma seminal, o autor usou solução fisiológica de krebs-ringer-fosfato.

Na tentativa de tornar o processo menos laborioso, SOUZA e MIES FILHO (1986) testaram uma solução de citrato de sódio a 3% para a lavagem do sêmen, em substituição à solução de krebs-ringer-fosfato, e não encontraram nenhuma diferença significativa. As duas soluções foram igualmente eficazes na remoção do plasma seminal quanto aos valores de motilidade e integridade do acrossoma, no entanto a confecção da solução de citrato é muito mais prática.

Mais tarde MACHADO e SIMPLÍCIO (1992), acrescentando citrato de sódio à solução de krebs-ringer-fosfato, obtiveram significativo aumento na viabilidade do sêmen caprino, quando este foi submetido à lavagem com o auxílio dessa solução.

Na busca de tornar o processo de conservação celular mais prático e menos danoso às células espermáticas, EVANS e MAXWELL (1987) propuseram a utilização de um diluente com baixa concentração de gema-de-ovo (2,6%). Mais recentemente, com o mesmo diluente utilizado por esses autores, AZERÊDO et al. (2001) avaliaram a ausência ou presença do plasma seminal no sêmen fresco e após o congelamento. As amostras que não foram submetidas à retirada do plasma foram mais bem conservadas, tanto a fresco, como após o descongelamento. Mediante os resultados encontrados, os autores afirmam que a remoção do plasma seminal causou redução significativa do percentual de espermatozóides móveis, bem como a diminuição dos danos à membrana plasmática.

Do mesmo modo, Nunes (1982), citado por LEBOEUF et al. (2000), acrescentou que os produtos oriundos das glândulas acessórias possuem componentes importantes na preservação dos espermatozóides de bode.

2.3.2. Diluentes à base de leite desnatado

O diluente leite desnatado é considerado um dos mais utilizados extensores de sêmen caprino para uso na inseminação artificial. A capacidade de fertilização dos espermatozóides estocados em diluente de leite ou à base de leite é de aproximadamente 12 a 24 horas. O leite é um meio fisiológico, porém complexo. Por isso este componente apresenta-se com muitas

variações nos resultados obtidos, e seus mecanismos de ação para preservação celular não estão bem elucidados (LEBOEUF et al., 2003).

O fosfocaseinato nativo é composto pelas caseínas do leite (α , β e κ). O método de purificação usado mantém sua estrutura tridimensional e a interação natural que ocorre entre eles. Na espécie eqüina, constatou-se que a β -lactoglobulina, uma proteína solúvel do leite, teve efeito protetor para a célula espermática (BATELIER et al., 1997). Entre as frações purificadas do leite, o fosfocaseinato nativo foi destacado como sendo o componente mais eficiente em preservar a motilidade e manter a fertilidade do sêmen eqüino estocado durante três dias, quando comparado a outros tipos de diluentes (LEBOEUF et al., 2003).

Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao leite, alguns autores observaram a presença de fatores tóxicos aos espermatozoides bovinos no leite não aquecido (THACKER et al., 1954). BOYD et al. (1954) sugeriram que o leite fresco, desnatado ou integral, seja aquecido ou tratado quimicamente com substâncias que contêm radicais sulfidrilas com o propósito de aumentar a viabilidade dos espermatozoides bovinos. Esse fator tóxico foi destacado por MIES FILHO (1987) como sendo uma lactenina, um agente enzimático antiestreptococos encontrado no leite, e que para eliminá-lo é necessário o aquecimento do diluente a 95°C, durante 10 minutos.

No entanto, várias modificações na estrutura do leite podem ser induzidas pelo aquecimento, como: aumento do diâmetro das micelas de caseína, desnaturação parcial de enzimas e proteínas, liberação de grupos sulfidrilas e diminuição na concentração de minerais devido à absorção de íons para as micelas de caseína. A desnaturação enzimática parece ser a modificação do leite mais importante para explicar a diferença na sobrevivência espermática entre o leite desnatado e o leite tratado pelo processo de ultra-alta temperatura (UAT), uma vez que o calor afeta somente as frações que contêm proteínas solúveis (BATELIER et al., 1997).

Em caprinos, a depreciação na sobrevivência espermática durante o armazenamento em diluentes à base de leite não é somente devido a fatores deletérios presentes no diluente, mas também devido a uma fração protéica semelhante à da glândula bulbouretral do bode, que interage com os constituintes do leite presentes no diluente, inibindo consideravelmente a

motilidade dos espermatozóides caprinos. Os componentes responsáveis por esse efeito têm sido recentemente purificados, caracterizados e identificados com uma triacilglicerol lipase (PELLICER, 1995). Essas frações protéicas são nomeadas de SBU III da glândula bulbouretral do bode (Nunes, 1982, citado por LEBOEUF et al., 2000). A adição da SBU III em meio contendo sêmen lavado resultou em diminuição da viabilidade espermática, quando esse estava em meio à base de leite; quando o sêmen foi diluído em solução de krebs-ringer-fosfato-glicose, a SBU III não teve efeito. Estes resultados evidenciam que qualquer enzima das glândulas bulbouretrais atuaria nos componentes da SBU III, desencadeando a produção de produtos tóxicos aos espermatozóides.

Observações realizadas com o auxílio do microscópio eletrônico revelaram que 95% dos espermatozóides da cauda do epidídimo sofreram reação acrossômica, após serem expostos às secreções da glândula bulbouretral em presença de diluente à base de leite. Quando espermatozóides foram expostos às secreções das glândulas vesiculares, apenas 5% dos espermatozóides sofreram reação acrossômica. Uma junção das secreções das duas glândulas (glândula vesicular = 2,5 µL/mL mais glândula bulbouretral = 2,5 µL/mL) causou 26,7% de reação acrossômica, indicando uma ação protetora das secreções da glândula vesicular (Courstens et al., 1984, citados por LEBOEUF et al., 2000).

Devido a essa complexidade da composição do leite, existem componentes que podem ser benéficos ou prejudiciais aos espermatozóides. Algumas frações do leite, como o ultrafiltrado, o microfiltrado e a α -lactoalbumina, diminuem a longevidade espermática, porém outras, como as proteínas solúveis e o foscaseinato nativo, exercem efeito protetor (BATELIER et al., 1997).

2.4. Testes de avaliação da integridade da membrana

Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que esta célula esteja morfológica e metabolicamente perfeita e com a membrana plasmática normal. A presença de uma membrana integral é um pré-requisito para que os eventos

relacionados ao processo da fertilização, como capacitação espermática, penetração através dos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida, reação acrossômica e fusão com o oolema, possam ocorrer (RODRIGUES-MARTINEZ et al., 1997).

Várias técnicas podem ser usadas para essa avaliação. Nos últimos anos o desenvolvimento de métodos de coloração com o uso de corantes supravitais e fluorescentes aumentou as possibilidades de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozóides (ZUCCARI, 1998).

A maioria das características seminais analisadas está relacionada com a viabilidade (WOELDERS, 1991). Alguns parâmetros são rotineiramente empregados para avaliação espermática, dentre os quais podem ser citadas a motilidade, a integridade do acrossoma, a integridade de membranas plasmáticas e a concentração espermática. A motilidade é avaliada rotineiramente por estimativa visual do número porcentual de espermatozóides móveis, adicionada ao julgamento subjetivo da velocidade de deslocamento. Vários outros métodos empregando mais tecnologias podem ser utilizados para essa avaliação, com a fotografia, a videografia e a análise computadorizada, que fornece um número muito grande de detalhes sobre o movimento do espermatozóide.

WOELDERS (1991) relatou, ainda, que vários resultados de ensaios *in vitro* para avaliar a qualidade espermática estão sendo comparados com resultados de fertilidade a campo, principalmente em bovinos e suínos, e que correlações entre as avaliações *in vitro* da qualidade espermática e a fertilidade a campo são geralmente baixas, mais isto não tira necessariamente o mérito dessas avaliações.

2.4.1. Teste hiposmótico

Uma vez que a membrana funcional é um requisito para que ocorra a fertilização, a avaliação desta propriedade espermática deve ser considerada como indicador da fertilidade (MELO, 1999).

O teste hiposmótico foi inicialmente proposto por JEYENDRAN et al. (1984), para avaliação de espermatozóides humanos. Este teste é

relativamente um novo ensaio usado com a intenção de avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide (MELO, 1999). O ensaio consiste no princípio de que o transporte de fluido ocorre através da membrana intacta sob condições hiposmóticas, até que o equilíbrio seja alcançado. Devido ao influxo de fluidos, a célula se expande principalmente na cauda, e estas mudanças podem ser prontamente observadas em microscópio de contraste de fase (JEYENDRAN et al., 1992). Por se tratar de um teste simples, alguns autores avaliaram o seu uso em outras espécies, como eqüinos (NEILD, 1999; MELO, 1999; MELO et al., 2002; DELL'AQUA et al., 2002; FÜRST, 2002), bovinos (SOLANILLA et al., 1993; ROTA et al., 2000), ovinos (OBERST et al., 2003; FUKUI et al., 2004), suínos (VASQUEZ et al., 1997), cães (INAMASSU et al., 1999; OLIVEIRA, 2003) e caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003).

Porém, alguns estudos têm apresentado resultados conflitantes, mas a controvérsia é mais freqüente devido à acurácia dos resultados (JEYENDRAN et al., 1992).

Várias associações têm sido feitas entre o teste hiposmótico e outros parâmetros espermáticos utilizados. Estas associações são freqüentemente significativas com a motilidade espermática e a coloração supravital, entretanto as correlações são geralmente baixas (MELO, 1999).

De acordo com a espécie estudada, essas correlações se modificam. Em eqüinos, NEILD et al. (1999) relatam correlações entre motilidade progressiva, espermatozóides morfológicamente normais e teste hiposmótico de $r = 0,75$ e $r = 0,51$ em sêmen fresco e $r = 0,26$ e $r = -0,22$ em sêmen congelado e descongelado. A correlação entre teste hiposmótico e membranas avaliadas por sondas fluorescentes foi de $r = 0,32$, no mesmo experimento.

Na espécie suína, VASQUEZ et al. (1997) compararam a utilização do teste hiposmótico com o teste de coloração fluorescente e eosina-nigrosina e constataram que os resultados não diferiram entre os testes. No entanto, o teste hiposmótico é recomendado para essa espécie por ser sensível e apresentar alta repetibilidade.

INAMASSU et al. (1999) avaliaram o sêmen de cães pelo teste hiposmótico e encontraram $80,62 \pm 8,05\%$ de caudas dobradas, mostrando uma correlação positiva e significativa $r = 0,877$ com a morfologia espermática e

uma correlação positiva e não-significativa $r = 0,148$ com a motilidade espermática.

Em ovinos, FUKUI et al. (2004) encontraram correlações significativas ($p < 0,05$) e positivas ($r = 0,57$) entre o teste hiposmótico e a motilidade espermática.

Na espécie caprina, FONSECA et al. (2001) testaram várias osmolaridades para a solução empregada no teste hiposmótico. As osmolaridades que proporcionaram maior dobramento de cauda foram as de 100 e 150 mOsm/L, porém naquele trabalho não foi feita nenhuma correlação com a motilidade pós-descongelamento, nem em relação a outros parâmetros espermáticos.

Ao avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos jovens e adultos por meio do teste hiposmótico, SANTOS et al. (2001) não encontraram correlação entre a motilidade progressiva para o sêmen fresco e o teste hiposmótico. Já para o sêmen congelado, foi encontrada uma correlação de 0,53.

SALGUEIRO et al. (2003) avaliaram sêmen caprino congelado e também observaram que a porcentagem de endosmose positiva só apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com relação ao sêmen pós-descongelamento.

2.4.2. Coloração supravital (eosina-nigrosina)

As colorações supravitais são também conhecidas como coloração de vivos e mortos. A ação desses corantes depende da integridade das membranas, de forma a impedir ou não a penetração dos mesmos no compartimento nuclear do espermatozóide (GARNER et al., 1986). Esta coloração avalia diretamente a integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça do espermatozóide.

SMITH e MURRY (1997) avaliaram diferentes técnicas de coloração para determinar a integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e descongelado de bovino e ovino. De acordo com os autores, a técnica que utiliza eosina-nigrosina tem como principais vantagens a rapidez e a facilidade em sua execução.

MELO (1999), utilizando a técnica de coloração de eosina-nigrosina em sêmen eqüino resfriado com diferentes meios diluentes, obteve taxas variando de 73,0 a 82,6 de espermatozóides vivos. De acordo com o autor a porcentagem de espermatozóides vivos foi superior quando o meio diluente apresentava gema-de-ovo em sua constituição. No mesmo estudo encontrou-se alto índice de correlação ($r = 0,75$; $P < 0,05$) entre a porcentagem de vivos e motilidade total e progressiva. Entretanto, vale ressaltar que esses parâmetros avaliam características celulares diferentes. Dessa forma, pode-se detectar perda de motilidade espermática sem ocorrer concomitantemente perda da integridade da membrana plasmática da cabeça do espermatozóide.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O experimento foi conduzido no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia de Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. A cidade está situada a 20° 45' 14" latitude sul e 42° 52' 53" longitude oeste, a uma altitude média de 752 m. O clima é CWA, segundo a classificação de Köppen (inverno seco e verão úmido), com temperatura média anual de 20,9°C e precipitação pluviométrica anual de 1.203 mm. O período experimental foi realizado durante o mês de agosto, portanto fora da estação reprodutiva normal para a espécie caprina criada nessa região, que é de março a junho.

3.2. Animais e alimentação

Foram utilizados quatro reprodutores caprinos adultos das raças Alpina e Saanen, sendo dois de cada raça, mantidos em baias individuais, apresentando histórico de fertilidade normal. De cada bode foram coletados cinco ejaculados, totalizando 20 coletas. Antes do período experimental, os animais foram submetidos a exame andrológico e considerados aptos de

acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Os animais receberam alimentação volumosa composta de silagem de milho e concentrado protéico, bem como sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria.

3.3. Coleta do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas à tarde, período em que a temperatura ambiente era superior a 18°C, para não comprometer o resfriamento de cada partida de sêmen.

Uma fêmea estrogenizada (50 mg de cipionato de estradiol) em cio, colocada em tronco próprio para a espécie caprina, foi utilizada como manequim.

Os bodes foram dispostos na frente da fêmea antes da coleta, bem como no momento em que outro bode era submetido à coleta, a fim de estimulá-los à cópula.

Para a coleta do sêmen foi utilizada a técnica da vagina artificial de modelo curto (MIES FILHO, 1982), aquecida a 40°C. Como revestimento da mucosa da vagina artificial, foram utilizados sacos plásticos em forma de funil, onde na extremidade mais fina era acoplado um tubo de centrífuga graduado de plástico (15 mL). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com material isotérmico, a fim de evitar mudanças bruscas de temperatura do sêmen com o meio ambiente. Em seguida, o tubo com o sêmen foi encaminhado ao laboratório, para ser analisado e processado.

3.4. Análises do sêmen

O tubo de coleta foi acondicionado em banho-maria, com temperatura de 37°C, onde já se encontravam os diluentes utilizados em cada tratamento.

Todo material utilizado na avaliação do sêmen foi previamente aquecido, em uma placa aquecedora regulada para uma temperatura de 37°C.

O volume da amostra foi obtido diretamente do tubo de coleta e medido em mL.

O turbilhonamento foi avaliado por meio da deposição de uma gota (10 μ L) em um microscópio óptico no aumento de 20X e classificado em uma escala de 0 (zero) a 5, admitindo-se zero como ausência deste parâmetro e 5, como o valor máximo de movimento massal.

A motilidade foi avaliada, colocando-se uma gota do sêmen entre a lâmina e a lamínula pré-aquecida e observada em microscópio óptico com aumentos de 20 e 40X, onde foram atribuídas notas porcentuais subjetivas de 0 (zero) a 100% em relação à quantidade de espermatozóides móveis totais.

A coloração supravital foi realizada com corante eosina-nigrosina. 10 μ L de sêmen foi homogeneizado com 10 μ L do corante, a 37°C, e depois foi realizado um esfregaço em lâmina para leitura em microscópio óptico com aumento de 40X. Foram consideradas normais as células que não se coraram, e as que se coraram de róseo foram consideradas lesadas.

O teste hiposmótico foi realizado em solução de frutose a 100 mOsm/L. Para esse procedimento, uma alíquota de 10 μ L de sêmen foi adicionada a um tubete plástico, contendo 1 mL da solução hiposmótica, e incubada em banho-maria a 37°C, por 1 hora. Após o término da incubação, foi colocada uma gota entre a lâmina e a lamínula e observada em microscópio óptico com um aumento de 100X. Foram considerados estruturalmente normais aqueles espermatozóides que durante a incubação sofreram dobramento da cauda, e os que não sofreram dobramento foram considerados com membrana afuncional (Figura 1).

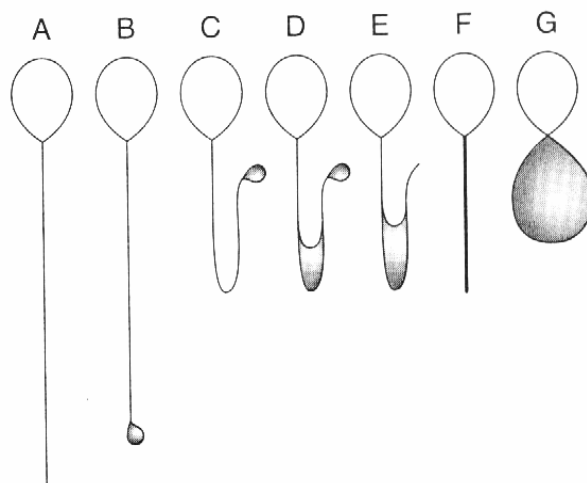


Figura 1 – Reação hiposmótica quando os espermatozóides são submetidos ao teste hiposmótico. (A = indica espermatozóide lesado, enquanto B, C, D, E, F e G indicam espermatozóides íntegros) (Fonte: SAMPER e MORRIS, 1998).

Para realização da concentração espermática foi retirada uma alíquota de 20 µL do sêmen, que foi diluída em 4 mL de solução de formol salina, resultando em um fator de diluição de 1:200 (sêmen:solução). O número de células espermáticas foi quantificado com o uso de uma câmara de Neubauer, e por meio de uma fórmula apropriada foi estimada a concentração total do ejaculado.

3.5. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em um fatorial 2 x 2, utilizando-se dois diluentes (leite em pó (1) e citrato-gema (2)) e duas curvas de resfriamento (curva de resfriamento 1 - CR1 = -0,03°C/minuto e curva de resfriamento 2 - CR 2 = -0,5°C/minuto). Foram realizadas cinco repetições por bode. O sêmen resfriado foi avaliado às 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas após a estabilização das amostras na temperatura de armazenamento (5°C).

3.6. Diluição do sêmen

Após as avaliações, a amostra de sêmen foi dividida em dois volumes iguais, em tubos graduados, e misturadas nos diluentes experimentais, na proporção de uma parte do volume seminal para uma parte do volume do diluente. Em seguida, tanto os tubos que continham o sêmen recém-diluído como os diluentes foram retirados do banho-maria e dispostos sobre a bancada do laboratório (temperatura ambiente), até que fossem realizadas as contagens dos espermatozoides e a posterior diluição para a concentração final de 100×10^6 de espermatozoides por mL.

Foram utilizados dois diluentes, um à base de leite (DOUGLAS-HAMILTON, 1984) e outro à base de gema-de-ovo, citrato-gema (MIES FILHO, 1987). As fórmulas dos diluentes estão descritas a seguir:

Diluyente leite em pó:

Glicose anidra	4,9 g
Leite desnatado	2,4 g
Bicarbonato de sódio a 10%.....	0,75 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL
Sulfato de gentamicina	8 mg/100 mL

Diluyente citrato-gema:

Citrato-gema:

Citrato de sódio diidratado.....	2,9 g
Gema-de-ovo	20 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL
Sulfato de gentamicina	8 mg/100 mL

Após dois diluentes confeccionados foi acrescentado o antibiótico sulfato de gentamicina, na dose de 10 mg/100 mL.

O sêmen diluído foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL, que foram então lacradas com álcool polivinílico.

3.7. Resfriamento do sêmen

Para o resfriamento do sêmen foram utilizadas duas metodologias. Na primeira (resfriamento lento – CR 1) foi utilizado um sistema passivo de resfriamento (DOUGLAS e HAMILTON, 1984) (Figura 2), que proporciona taxa de resfriamento de $-0,03^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, em que o tempo decorrido para que o sêmen alcance a temperatura de 5°C encontra-se em aproximadamente 8 horas. Na segunda (resfriamento rápido – CR 2), foi adotada a metodologia proposta por FÜRST (2002), a uma taxa de resfriamento média de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (Figura 4). As palhetas com o sêmen foram colocadas em um tubo de ensaio (Figura 3) de 20 mL, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo de ensaio revestido por um refil (saco plástico) foi colocado dentro de um recipiente de plástico de aproximadamente 240 mL, contendo 120 mL de álcool absoluto (Figura 3). O recipiente com as palhetas foi então colocado na posição horizontal dentro da geladeira.



Figura 2 – Equitainer®, sistema passivo de resfriamento de sêmen, utilizado para a realização da CR1.

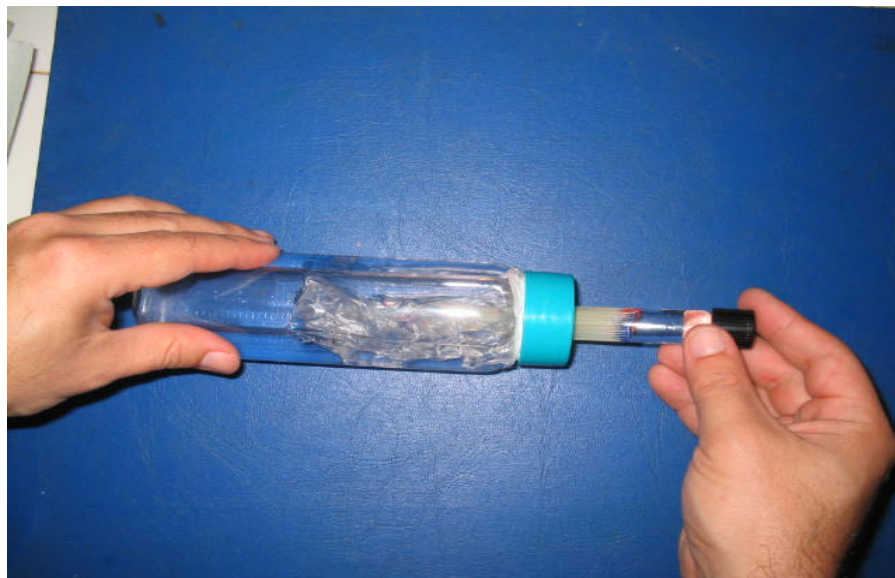


Figura 3 – Aparato plástico utilizado para a realização da CR2, segundo a metodologia de FÜRST (2002).

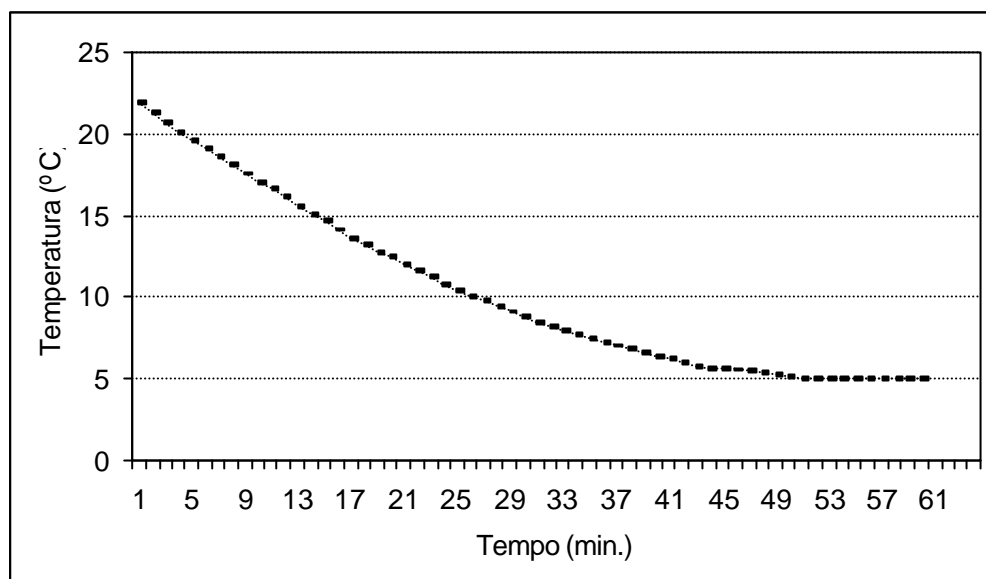


Figura 4 – Curva de resfriamento (CR2) realizada na geladeira, em função do tempo de acordo com FÜRST (2002).

Decorridos 35 minutos do início do resfriamento, o tubo de ensaio que continha as palhetas foi retirado do recipiente plástico e mantido à temperatura de geladeira por mais 25 minutos, perfazendo um tempo total de resfriamento de 60 minutos. A queda da temperatura foi medida, previamente, por meio de termômetro digital (+40°C e -40°C). Para isso, o sensor do termômetro foi introduzido na palheta contendo o meio de resfriamento.

Após o resfriamento, as palhetas foram acondicionadas na posição vertical no interior de uma caixa térmica (Isopor®), contendo água a 5°C. Esta metodologia permitia que a geladeira fosse aberta sem que as palhetas sofressem interferência das trocas de temperatura entre o interior da geladeira com o meio externo.

3.8. Análise do sêmen resfriado

O sêmen resfriado foi analisado 8 horas após o início do resfriamento. Este tempo foi suficiente para que todas as duas curvas completassem o tempo de queda com segurança, ou seja, garantiu que todas as amostras estivessem na temperatura final de resfriamento. As análises posteriores foram realizadas a intervalos de 8 horas, durante 48 horas.

Antes de cada observação, uma das palhetas, escolhida de forma aleatória, foi aquecida a 37°C, em banho-maria, por 1 minuto.

Para observação da motilidade e do vigor, os procedimentos adotados foram os mesmos descritos anteriormente para estes parâmetros. Logo depois foram retiradas alíquotas do sêmen para morfologia, que foram armazenadas em solução de formol salina.

O teste hiposmótico foi realizado conforme descrito anteriormente para o sêmen fresco.

Os procedimentos de coloração supravital também obedeceram aos mesmos critérios descritos para a avaliação do sêmen fresco.

3.9. Análise estatística

Para avaliação da motilidade, do vigor, da reação hiposmótica e dos espermatozoides corados, foi realizada a análise de variância, com parcelas subdivididas em função de bode, ejaculado, diluentes, curva de resfriamento e tempo de armazenamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sêmen fresco

Os dados referentes a motilidade, vigor, características morfológicas, hiposmótico e coloração supravital do sêmen fresco encontram-se dispostos na Tabela 1, de modo que as médias e os erros-padrão foram separados por bode.

Os valores médios de motilidade e vigor espermático de todos os bodes foram de $82,33 \pm 9,79$ e $3,93 \pm 0,41$, respectivamente. Estes valores, na mesma ordem anterior, assemelham-se aos encontrados por BETINI et al. (1998), que foram de $86,00 \pm 1,08$ e $3,66 \pm 0,11$, e por AZERÊDO et al. (2001), que foram de $85,41 \pm 4,65$ e $4,55 \pm 0,20$, respectivamente. Os valores encontrados neste experimento, assim como os dados dos autores citados, estão de acordo com os padrões preconizados para o sêmen caprino que se encontram no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), que recomenda o processamento e a utilização do sêmen caprino fresco que apresente valores de motilidade e vigor espermáticos acima de 70% e 3,0, respectivamente. Também pode ser observado que ocorreu uniformidade dos parâmetros analisados, quando comparados entre os bodes. Vale salientar que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando os bodes foram comparados entre si, com relação às variáveis descritas, evitando com isso o efeito do bode na qualidade espermática.

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão de motilidade, vigor, morfologia, teste hiposmótico e coloração supravital do sêmen fresco

Variáveis	Bodes				Médias
	1	2	3	4	
Motilidade (%)	80,00±12,74	88,00±7,58	90,00±8,66	75,00±13,22	82,33±9,79
Vigor (0-5)	3,90±0,22	4,10±0,22	4,20±0,67	3,70±0,27	3,93±0,41
HO (%)	27,60±16,28	21,25±4,19	37,50±25,31	37,20±36,39	27,00±19,65
Total corados (%)	14,60±9,28	10,40±5,59	6,60±3,64	8,50±6,02	9,80±7,40
Morfologia (%)					
Def. maiores	3,20±3,49	0,40±0,89	0,0	0,0	1,00±2,39
Def. menores	1,80±1,78	1,60±1,81	2,00±2,34	2,40±2,50	2,33±1,95

HO: teste hiposmótico; Total cor.: total de espermatozoides corados; Def. maiores: defeitos maiores; e Def. menores: defeitos menores.

Houve baixa correlação ($r = 0,11$ e $p > 0,05$) entre o teste HO e a motilidade total. Estes dados estão de acordo com os relatados por SANTOS et al. (2001), que não encontraram correlação entre a motilidade e os valores do teste hiposmótico. INAMASSU et al. (1999) confirmaram estes dados e verificaram uma correlação de $r = 0,14$, não-significativa, quando o parâmetro de comparação foi a motilidade do sêmen fresco de cães.

O número médio de células coradas pela eosina-nigrosina observadas foi de $9,80 \pm 7,40$, tendo algumas variações em relação ao bode, porém não-significativas ($p > 0,05$).

Os defeitos espermáticos maiores e menores observados na Tabela 1 estão de acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), que estabelece que o percentual de patologias no sêmen utilizado para procedimentos de armazenamento possua no máximo 20% de defeitos totais.

4.2. Sêmen resfriado

Na Tabela 2 estão os dados obtidos para a motilidade, o vigor, o total de espermatozoides corados (mortos) e o número de células espermáticas reativas ao teste hiposmótico (HO), em função dos diluentes, das curvas de do resfriamento e do tempo de armazenamento.

Tabela 2 – Dados de avaliações seminais pós-resfriamento de acordo com o tempo de armazenamento

	8 Horas	Motilidade	Vigor	Corados total	HOFR
Diluyente 1	CR1	32,75 b	2,65 b	44,25	19,15
	CR2	65,00 a	3,33 a	29,45	26,36
Diluyente 2	CR1	69,75 a	3,15 a	15,95	55,50
	CR2	75,50 a	3,30 a	15,05	61,20
16 Horas					
Diluyente 1	CR1	21,75 b	1,67 b	28,65	11,15 b
	CR2	53,25 a	2,90 a	23,45	41,05 a
Diluyente 2	CR1	59,50 a	2,60 a	12,55	53,50 a
	CR2	67,00 a	2,97 a	9,35	56,80 a
24 Horas					
Diluyente 1	CR1	17,75 b	1,38 b	28,00	8,65
	CR2	56,00 a	3,05 a	27,90	26,50
Diluyente 2	CR1	63,50 a	2,75 a	14,50	46,00
	CR2	70,50 a	3,17 a	13,50	56,85
32 Horas					
Diluyente 1	CR1	12,50 b	0,97 b	13,75 b	6,55 b
	CR2	51,50 a	2,92 a	30,30 a	30,75 a
Diluyente 2	CR1	62,25 a	2,77 a	13,55 b	57,15 a
	CR2	68,00 a	3,05 a	14,20 b	56,85 a
40 Horas					
Diluyente 1	CR1	9,00 b	0,75 b	8,00 b	4,90 b
	CR2	42,25 a	2,38 a	28,9 a	18,60 a
Diluyente 2	CR1	48,50 a	2,37 a	13,05 a	43,00 a
	CR2	55,75 a	2,52 a	13,95 a	47,20 a
48 Horas					
Diluyente 1	CR1	9,00 b	0,75 b	11,00 b	5,75 b
	CR2	36,50 a	2,25 a	30,15 a	22,05 a
Diluyente 2	CR1	46,75 a	2,30 a	12,90 a	46,30 a
	CR2	55,00 a	2,47 a	11,84 a	43,25 a

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As comparações foram realizadas dentro de cada diluyente. Diluyente 1 - leite desnatado, diluyente 2 - citrato-gema, CR 1- curva de resfriamento 1 (lenta) e CR 2 - curva de resfriamento 2 (rápida).

Com relação aos valores encontrados para a motilidade e o vigor (Figuras 5 e 6 e Tabela 2), observa-se que houve interação entre os diluentes e as curvas de resfriamento em todos os tempos de avaliação. A associação do diluente à base de leite em pó desnatado (diluente 1) com a curva de resfriamento lenta (CR 1) apresentou menores valores de motilidade e vigor ($p < 0,05$) em relação ao mesmo diluente associado à curva rápida (CR 2). O mesmo não foi observado quando o diluente 2 foi associado às curvas de resfriamento, onde não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre as curvas de resfriamento em todos os tempos observados para esses dois parâmetros.

De acordo com McKINNON (1996), quando as células espermáticas são mantidas a 5°C ocorre a diminuição do metabolismo para valores de 10%, quando comparado com o das células mantidas à temperatura de 37°C. Em consequência, a produção de catabólitos é menor e a peroxidação da membrana plasmática será mais lenta, de modo que o desgaste da célula não ocorra tão rápido. Porém, essas diferenças não se limitaram apenas à curva de resfriamento, mas também ao diluente utilizado.

Na CR 1, o diluente 1 não obteve bom êxito na preservação da motilidade e do vigor, quando comparado ao diluente 2. Esses dados refletiram a menor estabilidade do diluente 1 juntamente com a curva de resfriamento lento, já que o sêmen mantido no diluente 2 foi também submetido à mesma curva de resfriamento. Os dados observados ao final das 48 horas de armazenamento, para a motilidade e o vigor, do sêmen no diluente 1 na CR 1 e para o diluente 2 nas CR 1 e CR 2 estão de acordo com o preconizado pelo Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 1998), exceto para o diluente 1 na CR 1.

Com relação aos meios diluentes, o diluente à base de leite desnatado quando submetido a CR 1 não apresentou motilidade e vigor satisfatórios na preservação do sêmen caprino ao longo das 48 horas de observação. Porém, o mesmo obteve bom resultado quando a CR 2 foi utilizada, demonstrando que o diluente à base de leite desnatado preserva melhor as células espermáticas quando uma curva mais rápida é empregada (CR 2). No entanto, BATELIER et al. (1997) relataram que o leite é um meio fisiológico complexo, apresentando mais de 100.000 moléculas, podendo levar a efeitos benéficos e deletérios à sobrevivência espermática, e que seus mecanismos de ação não estão bem

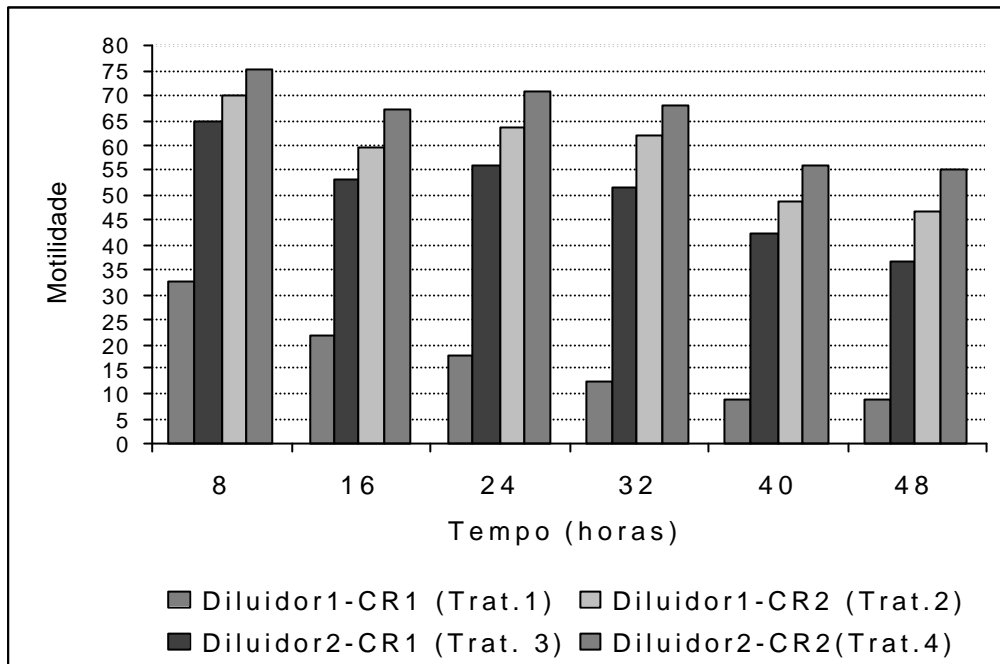


Figura 5 – Motilidade do sêmen resfriado de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.

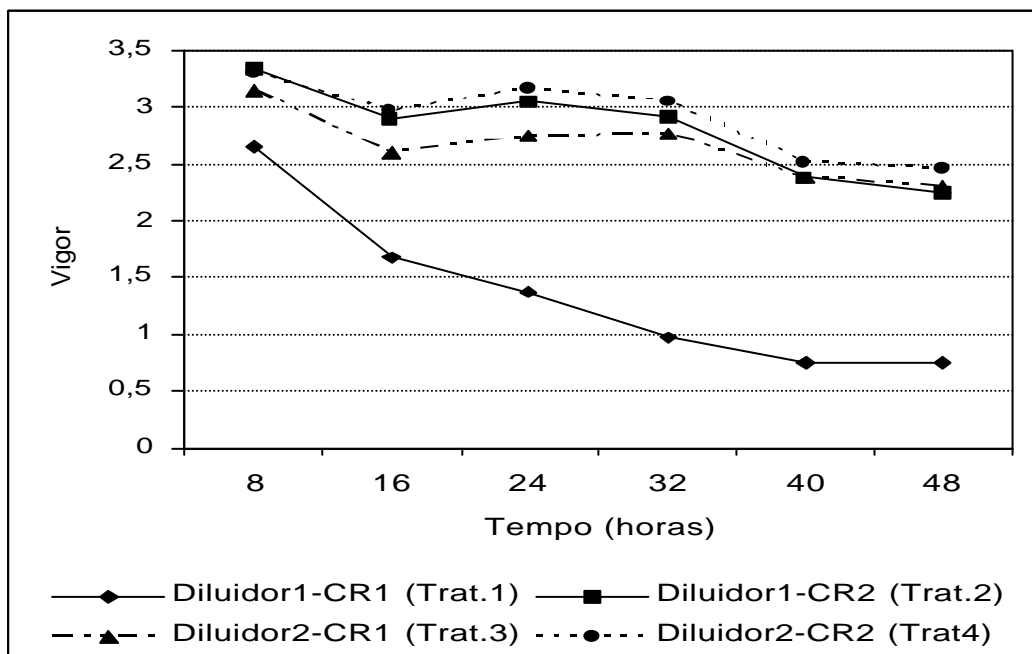


Figura 6 – Vigor do sêmen resfriado de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.

elucidados. Portanto, as diferenças de motilidade e vigor existentes entre as curvas de resfriamento podem ter ocorrido por causa do tempo que as curvas levaram para alcançar a temperatura final de armazenamento (5°C). A CR 1 levou aproximadamente 8 horas para atingir essa temperatura, enquanto a CR 2 levou cerca de 1 hora. Estas diferenças observadas no tempo percorrido podem ter sido geradas pelo maior tempo em que os espermatozoides submetidos a CR 1 no diluente 1 produziram metabólitos, proporcionando maior consumo de nutrientes ou provocando instabilidade dos componentes do diluente à base de leite desnatado. Apesar da impossibilidade de inferência estatística entre os diluentes, quando comparada aos valores absolutos, o diluente 2 apresentou, em relação ao diluente 1, maior capacidade de preservar as células espermáticas ao longo do tempo. Uma das razões para que esta observação fosse confirmada pode ser explicada pelas conclusões de ROLLEMA (1992), que descreveu que os benefícios promovidos pelas micelas de caseína são necessários à proteção espermática quando as células são armazenadas a temperaturas de 15°C, não tendo efeito na temperatura de 4°C. Esses resultados são relacionados à destruição parcial das micelas de caseína a 4°C, por causa da alta solubilidade da α -caseína a esta temperatura. Apesar do relato dos autores anteriores, neste experimento não foi notada nenhuma impossibilidade da utilização do leite desnatado como diluente, desde que a curva de resfriamento seja rápida.

O sêmen no diluente 2 (citrato-gema), quando submetido às duas curvas de resfriamento, revelou comportamento semelhante, ou seja, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o sêmen submetido à CR 1 e à CR 2, mesmo quando estas apresentaram maior ou menor tempo para alcançar a temperatura de armazenamento, respectivamente. A gema-de-ovo é considerada protetora contra o choque térmico ocorrido na fase lipídica de transição (DROBNIS et al., 1993). A invariabilidade dos resultados obtidos nas duas curvas de resfriamento nesse diluente reflete a maior capacidade da gema-de-ovo em proteger as células espermáticas contra as mudanças de temperatura durante o processo de resfriamento. Esta estabilidade é justificada pela presença, na gema-de-ovo, de substâncias como fosfolipídios, lecitinas, lipoproteínas e cefalinas (WATSON, 1995).

A CR 2, que apresenta taxa de resfriamento média de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, mostra-se mais prática e rápida que a CR 1, pois de acordo com MACHADO e SIMPLÍCIO (1995), para o sêmen caprino, o ritmo de refrigeração deve estar compreendido entre $-0,25$ e $-0,35^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, até que seja atingida a temperatura de 5°C . Segundo MORAN (1992), WATSON (1995) e GRAHAM (1996), a taxa de resfriamento lento é somente necessária no período em que os espermatozoides são mais sensíveis ao choque pelo frio, que está compreendida entre 18 e 8°C . Porém, neste experimento, não foi observado prejuízo à preservação espermática em relação à utilização da curva de resfriamento rápida, com queda de temperatura de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

Quanto à integridade da membrana plasmática, avaliada pela coloração supravital (eosina-nigrosina), podem ser observadas variadas respostas dessa características em relação ao tempo de armazenamento (Figura 7). Com 8 horas de resfriamento constatou-se maior número de células coradas (mortas) quando o diluente utilizado foi o leite desnatado (diluente 1), em ambas as curvas de resfriamento (CR 1 e CR 2), não se observando diferença estatística ($p < 0,05$). Neste horário, o diluente 2 apresentou menor número de células coradas, independentemente da curva de resfriamento imposta ao sêmen.

Às 16 e 24 horas, não foi observada diferença estatística entre os diluentes e as curvas estudadas. Estas diferenças possivelmente não tenham ocorrido devido ao elevado desvio-padrão das amostras (Apêndice 1). Após decorridas 32 horas de resfriamento, pode ser observado maior número de células danificadas quando o diluente 1 foi utilizado na CR 2, em relação o mesmo diluente na CR 1.

Nas 32, 40 e 48 horas de resfriamento, foi observado menor número de células coradas quando o sêmen foi mantido no diluente 1 na CR 1, em comparação às demais combinações entre diluente e curva de resfriamento

Foi observado que no sêmen mantido no diluente 1 e submetido à curva de resfriamento lento (CR 1) ocorreu diminuição do número de células coradas ao longo do tempo de armazenamento, o que deveria ser o inverso, pois se com o passar do tempo está ocorrendo morte de células, seria esperado que ocorresse um aumento no número de células coradas. Porém, não foi encontrada na literatura consultada nenhuma observação plausível que viesse a explicar tal fato.

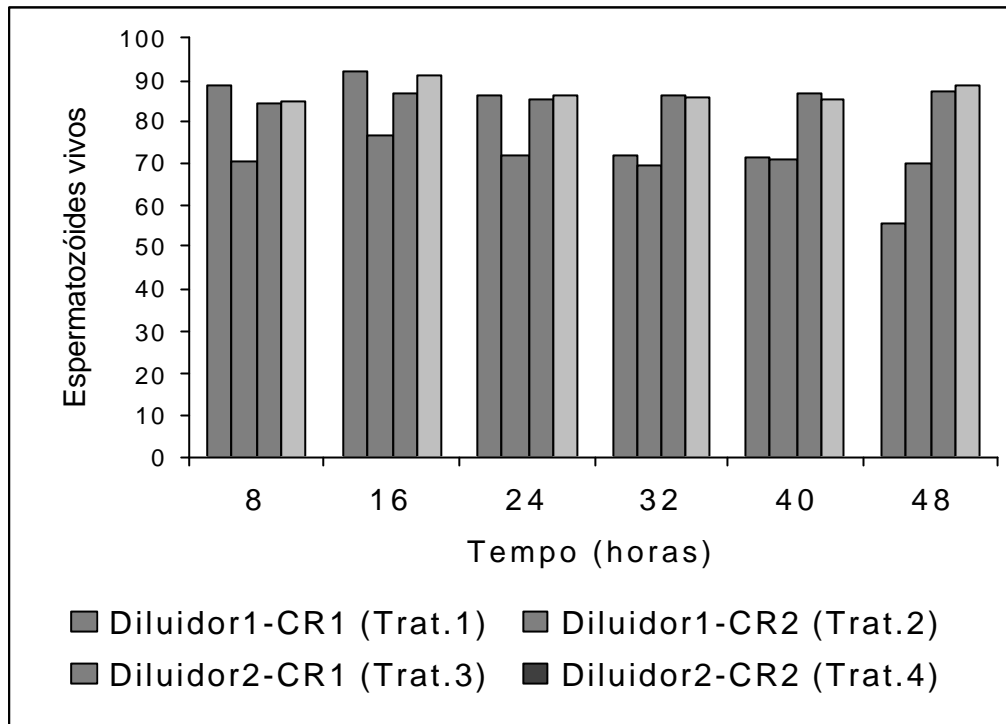


Figura 7 – Valores percentuais de sobrevivência espermática de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.

Os dados obtidos estão de acordo com os encontrados por MELO (1999), que avaliou o sêmen resfriado de garanhões a 5°C mantidos em um diluente à base de gema-de-ovo e outro à base de leite desnatado. O autor relatou que quando o sêmen foi mantido em diluentes contendo gema-de-ovo o número de espermatozoides considerados vivos (não-corados) foi, em geral, superior aos espermatozoides que estavam móveis.

ZUCCARI et al. (1998) utilizaram sêmen bovino mantido sob refrigeração e observaram boa preservação da integridade da membrana plasmática avaliada pela técnica da fluorescência, mesmo para espermatozoides com motilidade inferior a 10%. De acordo com os resultados obtidos, concluíram que o sêmen apresentou resistência satisfatória quando submetido à refrigeração, e a manutenção da integridade estrutural das células mostrou-se superior à metabólica, assemelhando-se aos resultados encontrados neste experimento.

Os resultados encontrados para o teste hiposmótico (HO) foram variados (Figura 8), não se observando regularidade dos valores obtidos dentro de cada

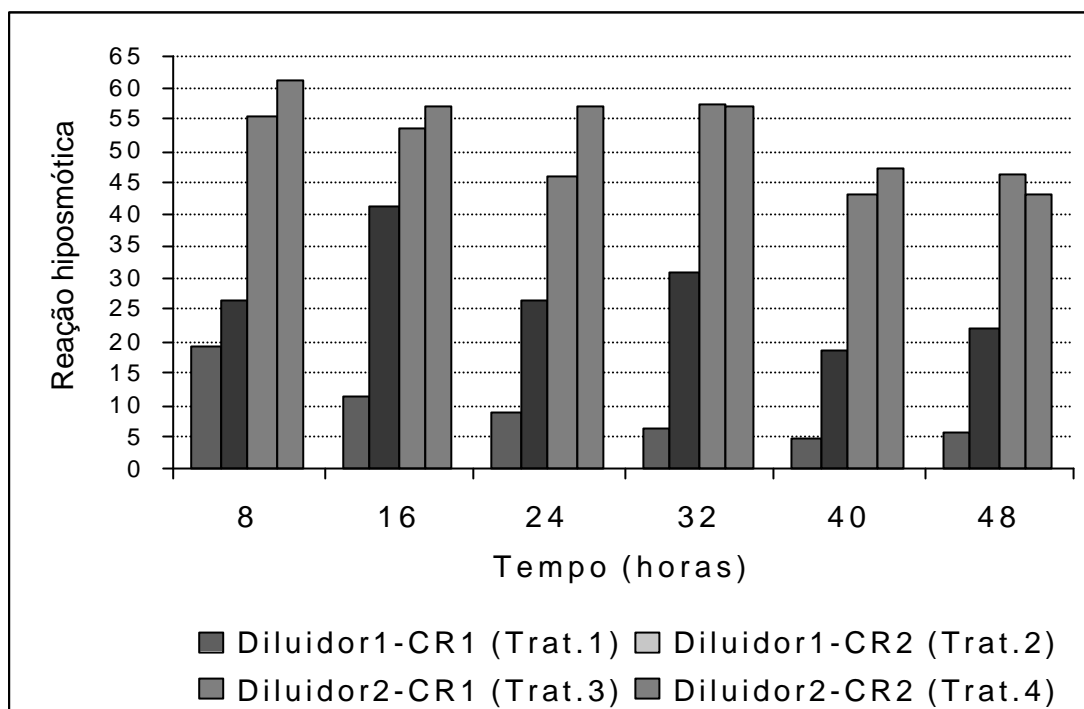


Figura 8 – Valores percentuais de reação ao teste hiposmótico de acordo com os diluentes e as curvas de resfriamento durante 48 horas, a 5°C.

tempo de armazenamento. Quando o teste HO foi realizado nas 8 horas de resfriamento, não foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos; possivelmente a ausência na diferença entre os tratamentos está no desvio-padrão elevado (Apêndice A), configurando uma instabilidade nos resultados quando as leituras foram realizadas. O mesmo comportamento foi observado para as 24 horas de armazenamento. No tempo de 16 horas não foram verificadas diferenças estatísticas nas associações entre diluentes e curvas de resfriamento, quando o diluente 2 foi utilizado. Quando este diluente foi empregado, houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as curvas de resfriamento.

Para os tempos de 32, 40 e 48 horas, o número de reações esperáticas, nestes tempos, seguiu comportamento similar.

Quando o teste HO é analisado com relação à motilidade, por exemplo, independentemente do tempo avaliado, pode-se notar que os valores são contrastantes (Apêndice B). VASQUEZ et al. (1997) estudaram o teste HO no sêmen suíno e compararam-no a outros métodos de análise da membrana esperática, no sêmen fresco. Segundo esses autores, as diferenças nas

porcentagens de reação hiposmótica obtidas podem ser devido ao fato de o teste HO avaliar diferentes aspectos da membrana, ou simplesmente pelo fato de a membrana de alguns espermatozóides ser inativada ao entrar em contato com a solução hiposmótica.

Deve ser ressaltado que além de esses testes medirem diferentes aspectos da membrana, eles avaliam também diferentes regiões das membranas do espermatozóide, que são estrutural e funcionalmente distintas (KOEHLER, 1985; WATSON, 1995).

5. CONCLUSÕES

A eficiência do diluente utilizado é dependente da taxa de resfriamento imposta ao sêmen nele diluído.

O diluente leite desnatado apresenta melhor preservação celular quando a curva utilizada é a rápida.

O diluente citrato-gema apresentou ser um bom diluente, uma vez que proporcionou a melhor proteção às células espermáticas, independentemente da curva de resfriamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 715-745, 1993.

AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 147, 1987.

AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H. et al. Seminal plasma effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.

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

BATELIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, G. et al. Advances in cooled semen technology. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-410, 1997.

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, C. R. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 3, p. 361-365, 1998.

BOYD, E. N.; PERKINS, J. R. OLDS, D. The longevity of bovine spermatozoa in chemical and heat-treated pasteurized milk. **J. Dairy Sci.**, v. 37, p. 650, 1954.

CAMPOS, A. C. M.; FERREIRA, M. A. L.; PINHEIRO, J. H. T. et al. Resfriamento a 4°C do sêmen caprino diluído em água de coco. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 430-431, 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. p. 25-27.

CORTEEL, J. M. Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma, glucose effect. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v. 14, p. 741-745, 1974.

DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S. et al. Novo teste de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, n. 3, p. 189-191, 2002.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G. et al. A field study of the fertility transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, n. 3, p. 291-304, 1984.

DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREERT, J. W.; CROWE, J. H. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zool.**, v. 265, p. 432-7, 1993.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. **Butterworths**, Sydney, 1987. 194 p.

FASTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 251-260, 1996.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F. et al. Hypoosmotic swelling test in got spermatozoa. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 436-438, 2001.

FUKUI, Y.; TOGAWA, M.; ABE, N. et al. Validation of the sperm quality analyzer and the hyposmotic swelling test for frozen-thawed ram and minke whale (*Balaenoptera bonarensis*) spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 147-154, 2004.

FUKUI, Y.; TOGAWA, M.; ABE, N. et al. Validation of sperm quality analyzer and the hypo-osmotic swelling test for frozen-thawed ram and minke whale (*Balaenoptera bonarensis*) spermatozoa. **J. Reprod. Dev.**, v. 50, n. 1, p. 147-154, 2004.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade**. 2002. 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v. 34, p. 127-38, 1986.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnica aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 15-23; 57-65; 111-23, cap. 2, 4 e 7, 2001.

GONZALES, I. M.; SOARES, A. T.; GOMES, M. G. G.; SOUSA, W. H. **Reprodução assistida em caprinos**. Paraíba, Set. 2002, p. 11-42.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North. Am.**, v. 12, p.131-147, 1996. (Equine Practice).

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 3-23, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal 2004**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 06 Dez. 2005.

INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermiáticas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p. 302-304, 1999.

IRITANI, A.; NISCHIKAWA, Y. Studies on the egg-yolk coagulating factors in goat semen: II Properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. In: PROC. SILVER LUBILEE LAB. ANIM. HUSBANDRY, Kyoto University, p.97-104, 1961.

IRITANI, A.; NISCHIKAWA, Y.; FUKUHARA, R. Studies on the egg-yolk coagulating factors in goat semen: I. Localization of coagulating factors and becline of pH following coagulating. In: PROC. SILVER LUBILEE LAB. ANIM. HUSBANDRY, Kyoto University, p. 89-96, 1961.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Veterinaria**, v. 10, p. 156-65, 1994.

JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1059-1067, 1991.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fert.**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; ZANEVELD, L. J. D. The hypoosmotic swelling test: an update. **Arch. of Androl.**, v. 29, p. 105-116, 1992.

KAYSER, J. P.; AMANN, R. P.; SHIDELER, R. K. et al. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 601-614, 1992.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104 p. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1998.

KOEHLER, J. K. Sperm membrane: segregated domains of structure and function. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF BOAR SEMEN, 1., 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: [s.n.], 1985. p. 37-60.

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, Ph.; BATELLIER, F. et al. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 867-877, 2003.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 38., 1992, Orlando: AAEP, p. 629-647, 1992.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, p. 61-72, 1995.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. **Effect of two washing solutions on sperm survival of bucks**. In: INTERNATIONAL GOAT ASSOCIATION EDS., p. 1089-1094, 1992.

MAGISTRINI, M.; COUTY, Y.; PALMER, E. Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluents on fresh stallion sperm survival. **Acta Vet. Scand. Suppl.**, v. 88, p. 97-110, 1992.

McKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Austr. Equine Vet. J.**, v. 14, p. 156-175, 1996.

McKINNON, A. O.; WALKER, J. B. Effect of ambient temperature and container on temperature of extended equine semen. **World Equine Veterinary Review**, v. 3, n. 1, p. 5-11, 1998.

MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N.; GIRÃO, E. S.; PIMENTEL, J. C. M. **Caprinos: Princípios básicos para sua exploração**. Teresina: Embrapa-CPAMN/SPI, 1994, p. 63-78.

MELO, M. V. I. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino**. 1999. 67 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

MELO, M. V. I.; SNOECK, P. P. N.; BISPO, C. A. S.; HENRY, M. Efeito da solução e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para o sêmen eqüino congelado. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v. 27, n. 3, p. 379-380, 2003.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 2, p.701.

MIES FILHOS, A.; SOUZA, I. M. Congelação do sêmen de bode: Efeito de duas soluções de lavagem. **A Hora Veterinária**, Ano 5, n. 29, p. 53-58,

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold-shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 291-304, 1992.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO, V. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721-727, 1999.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1, 1994, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBRAD, 1994. 63 p.

OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. et al. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.

OLIVEIRA, E. C. S. **Efeito de diferentes diluentes sobre a criopreservação do sêmen canino**. 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

PELLICER, M. T. **Purificación y caracterización del componente de la secreción bulbouretral de macho cabrio implicado en el deterioro de la cálida de los espermatozoides diluidos en leche.** In: Tesina de Licenciatura. Universidad de Murcia, 1995. 200 p.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A., A yolk-buffer pabulum for preservation of bull sperm. **J. Dairy Sci.**, v. 23, p. 399-404, 1940.

PICKET, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O. e VOSS, S. L. (Ed.) **Equine reproduction.** Malvern: Lea e Febiger, p. 746-754, 1993c.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **J. Reprod. Fert.**, v. 60, p. 403-407, 1980.

RITAR, A. J. Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-production goats in Australia: A review. **Aust. J. Exp. Agric.**, v. 33, p. 807-820, 1993.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J. M. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Rum. Res.**, v. 25, p. 147-153, 1997.

RODRIGUES-MARTINEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos in vivo and in vitro. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 25, p. 108-126, 1997.

ROLLEMA, H. S. Casein association and micelles formation. In: FOX, P. F. (Ed.) **Advanced dairy chemistry B 1: Proteins.** New York: Elsevier Science, p. 111-140, 1992.

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

ROY, A. Egg yolk-coagulation enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, n. 179, p. 318-319. 1957.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 77-111, 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. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 3, p. 377-378, 2003.

SAMPER J. C.; MORRIS, C.A. Current methodology for stallion semen crypreservation. A survey. **Theriogenology**, v. 49, p. 895-903, 1998.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. et al. Uso do teste hipoosmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, p. 438-439, 2001.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic of the structure of cell membranes. **Science**, n. 175, p. 720-731, 1972.

SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Staining techniques in spermatozoa. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v. 57, p. 246-250, 1997.

SOLANILLA E.; ESPINOSA, E.; GIL, L. et al. Determinación del test de endosmosi (H. O. S.) en semen de ganado vacuno de raza frizona en relación con la temperatura, osmolaridad y dilución. In: ITEA. In: V JORNADA SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL, vol. extra, n. 12, Tomo II, 1993.

SOLANO, R. F.; MARTO, R.; PEREIRA, H. S. Inseminação artificial em cabras: Avaliação da colocação do sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v. 23, n. 3, p. 365-67, 1999.

SOUZA, I. M.; MIES FILHO, A. Congelação do sêmen de bode. Efeito de duas soluções de lavagem. **A Hora Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 53-58, 1986.

STRYER, L. Biochemistry. In: FREEMAN, W. H. (Ed.) **Introduction to biological membranes**. 3. ed. New York, 1988. p.283-310.

THACKER, D. L.; FLIPSE, R. J.; ALMIQUIST, J. O. Diluters for bovine semen. II. Effect of milk proteins upon spermatozoa liviability. **J. Dairy Sci.**, v. 37, p. 220, 1954.

TRALDI, A. de S. **Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos** – Manual técnico. Texto apostilado, 1994.

VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, v. 47, p.913-922, 1997.

VERNER D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. et al. Effects of cooling rates storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

VERNER, D. D. Semen preservation in stallions: possibilities and limitations. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 13, n. 2, p. 289-291, 1991.

VERNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, J. A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored or 24 hours at 5°C or 20°C. **Theriogenology**, v. 32, p. 515-525, 1989.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. **J. Reprod. Fertil.**, v. 62, p. 483-492, 1981.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189.

WILHEM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effect of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, p. 320-329, 1996.

WOELDERS, H. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. In: JOHNSON, L. A., RATH, D. (Ed.) **Reprod. Dom. Anim.** Berlin: Paul Parey, 1991. p. 145-164. Proceedings of the Second International Conference on Boar Semen Preservation, 1991.

ZÚCCARI, C.E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ANÁLISES DE VARIÂNCIA APLICADAS AOS EFEITOS DAS CURVAS DE RESFRIAMENTO SOBRE OS DILUENTES, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO

Tabela 1A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 8 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	39955.00			
Total de resíduo	41	33261.25	811.2500	4,61	0,0000
BODE	3	607.5000	202.5000	0,42	*****
Erro A	16	7747.500	484.2188		
Diluyente	1	11281.25	11281.25	74,07	0,0000
Erro B	19	2893.750	152.3026		
CR	1	7220.000	7220.000	40,99	0,0000
CR x diluyente	1	3511.250	3511.250	19,93	0,0001
Resíduo	38	6693.750	176.1513		

CV (%) = 21,847.

Tabela 2A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	56288.75			
Total de resíduo	41	48623.75	1185.945	5,88	0,0000
BODE	3	2373.750	791.2500	0,73	*****
Erro A	16	17315.00	1082.188		
Diluyente	1	13261.25	13261.25	48,56	0,0000
Erro B	19	5188.750	273.0921		
CR	1	7605.000	7605.000	37,70	0,0000
CR x diluyente	1	2880.000	2880.000	14,28	0,0005
Resíduo	38	7665.000	201.7105		

CV (%) = 28,194.

Tabela 3A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	53174.69			
Total de resíduo	41	45007.81	1097.752	5,11	0,0000
BODE	3	2260.938	753.6458	2,09	0,1183
Erro A	16	5782.500	361.4062		
Diluyente	1	18150.31	18150.31	93,37	0,0000
Erro B	19	3693.438	194.3914		
CR	1	10237.81	10237.81	47,64	0,0000
CR x diluyente	1	4882.812	4882.812	22,72	0,0000
Resíduo	38	8166.875	214.9178		

CV (%) = 28,226.

Tabela 4A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	57909.69			
Total de resíduo	41	51662.81	1260.069	7,67	0,0000
BODE	3	2598.438	866.1458	1,93	0,1406
Erro A	16	7167.500	447.9688		
Diluyente	1	21945.31	21945.31	94,53	0,0000
Erro B	19	4410.938	232.1546		
CR	1	10012.81	10012.81	60,91	0,0000
CR x diluyente	1	5527.812	5527.812	33,63	0,0000
Resíduo	38	6246.875	164.3914		

CV (%) = 26,402.

Tabela 5A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	62598.75			
Total de resíduo	41	55055.00	1342.805	6,76	0,0000
BODE	3	3651.250	1217.083	1,04	0,3868
Erro A	16	18760.00	1172.500		
Diluyente	1	14045.00	14045.00	38,03	0,0000
Erro B	19	7017.500	369.3421		
CR	1	8201.250	8201.250	41,31	0,0000
CR x diluyente	1	3380.000	3380.000	17,03	0,0002
Resíduo	38	7543.750	198.5197		

CV (%) = 36,244.

Tabela 6A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro motilidade espermática

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	61062.19			
Total de resíduo	41	54042.81	1318.117	7,14	0,0000
BODE	3	3113.438	1037.812	0,81	*****
Erro A	16	20530.00	1283.125		
Diluyente	1	15820.31	15820.31	47,44	0,0000
Erro B	19	6335.938	333.4704		
CR	1	6390.312	6390.312	34,59	0,0000
CR x diluyente	1	1852.812	1852.812	10,03	0,0030
Resíduo	38	7019.375	184.7204		

CV (%) = 36,920.

Tabela 7A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 8 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	36.84687			
Total de resíduo	41	29.75313	0.7256860	3,89	0,0000
BODE	3	1.834375	0.6114583	0,58	*****
Erro A	16	16.82500	1.051562		
Diluyente	1	1.128125	1.128125	4,13	0,0491
Erro B	19	5.184375	0.2728618		
CR	1	3.403125	3.403125	18,23	0,0001
CR x diluyente	1	1.378125	1.378125	7,38	0,0099
Resíduo	38	7.093750	0.1866776		

CV (%) = 36,920.

Tabela 8A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	114.3875			
Total de resíduo	41	91.80000	2.239024	3,77	0,000
BODE	3	5.562500	1.854167	0,62	*****
Erro A	16	47.82500	2.989063		
Diluyente	1	5.000000	5.000000	5,59	0,0233
Erro B	19	17.00000	0.8947368		
CR	1	12.80000	12.80000	21,53	0,0000
CR x diluyente	1	3.612500	3.612500	6,08	0,0183
Resíduo	38	22.58750	0.5944079		

CV (%) = 36,920.

Tabela 9A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	109.3875			
Total de resíduo	41	83.75000	2.042683	3,03	0,0004
BODE	3	6.412500	2.137500	1,60	0,2050
Erro A	16	21.35000	1.334375		
Diluyente	1	11.25000	11.25000	14,37	0,0005
Erro B	19	14.87500	0.7828947		
CR	1	22.05000	22.05000	32,68	0,0000
CR x diluyente	1	7.812500	7.812500	11,58	0,0016
Resíduo	38	25.63750	0.6746711		

CV (%) = 31,744.

Tabela 10A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	120.8719			
Total de resíduo	41	95.02813	2.317759	3,41	0,0001
BODE	3	5.134375	1.711458	1,45	0,2444
Erro A	16	18.92500	1.182812		
Diluyente	1	18.52812	18.52812	25,77	0,0000
Erro B	19	13.65938	0.7189145		
CR	1	24.75313	24.75313	36,40	0,0000
CR x diluyente	1	14.02812	14.02812	20,63	0,0001
Resíduo	38	25.84375	0.6800987		

CV (%) = 33,920.

Tabela 11A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	142.7469			
Total de resíduo	41	116.2531	2.835442	4,07	0,0000
BODE	3	10.68437	3.561458	1,12	0,3541
Erro A	16	51.00000	3.187500		
Diluyente	1	15.75313	15.75313	24,57	0,0000
Erro B	19	12.18437	0.6412829		
CR	1	15.75313	15.75313	22,59	0,0000
CR x diluyente	1	10.87813	10.87813	15,60	0,0003
Resíduo	38	26.49375	0.6972039		

CV (%) = 41,619.

Tabela 12A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro vigor espermático

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	124.4969			
Total de resíduo	41	99.92813	2.437271	3,77	0,0000
BODE	3	5.809375	1.936458	0,76	*****
Erro A	16	40.87500	2.554688		
Diluyente	1	15.75313	15.75313	20,38	0,0001
Erro B	19	14.68438	0.7728618		
CR	1	14.02812	14.02812	21,70	0,0000
CR x diluyente	1	8.778125	8.778125	13,58	0,0007
Resíduo	38	24.56875	0.6465461		

CV (%) = 41,368.

Tabela 13A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 8 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	42687.55			
Total de resíduo	41	38707.05	944.0744	9,01	0,0000
BODE	3	7832.050	2610.683	2,57	0,0686
Erro A	16	16265.50	1016.594		
Diluyente	1	9116.450	9116.450	52,58	0,0000
Erro B	19	3294.550	173.3974		
CR	1	1232.450	1232.450	11,77	0,0015
CR x diluyente	1	966.0500	966.0500	9,22	0,0043
Resíduo	38	3980.500	104.7500		

CV (%) = 39,101.

Tabela 14A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	31468.00			
Total de resíduo	41	17624.80	429.8732	1,18	0,3045
BODE	3	816.8000	272.2667	0,48	*****
Erro A	16	9126.200	570.3875		
Diluyente	1	4560.200	4560.200	31,52	0,0000
Erro B	19	2748.800	144.6737		
CR	1	352.8000	352.8000	0,97	*****
CR x diluyente	1	20.00000	20.00000	0,05	*****
Resíduo	38	13843.20	364.2947		

CV (%) = 103,17.

Tabela 15A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes à 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	32479.95			
Total de resíduo	41	20810.05	507.5622	1,65	0,0605
BODE	3	1171.450	390.4833	0,56	*****
Erro A	16	11143.00	696.4375		
Diluyente	1	3892.050	3892.050	16,10	0,0003
Erro B	19	4593.450	241.7605		
CR	1	6.050000	6.050000	0,02	*****
CR x diluyente	1	4.050000	4.050000	0,01	*****
Resíduo	38	11669.90	307.1026		

CV (%) = 83,549.

Tabela 16A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes à 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	24563.80			
Total de resíduo	41	17235.05	420.3671	2,18	0,0085
BODE	3	830.9000	276.9667	0,50	*****
Erro A	16	8853.400	553.3375		
Diluyente	1	1328.450	1328.450	7,26	0,0105
Erro B	19	3479.050	183.1079		
CR	1	1479.200	1479.200	7,67	0,0086
CR x diluyente	1	1264.050	1264.050	6,55	0,0146
Resíduo	38	7328.750	192.8618		

CV (%) = 77,368.

Tabela 17A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	27033.95			
Total de resíduo	41	19637.15	478.9549	2,46	0,0030
BODE	3	2930.450	976.8167	1,94	0,1396
Erro A	16	8056.500	503.5312		
Diluyente	1	490.0500	490.0500	2,46	0,1250
Erro B	19	3783.950	199.1553		
CR	1	2376.200	2376.200	12,21	0,0012
CR x diluyente	1	2000.000	2000.000	10,27	0,0027
Resíduo	38	7396.800	194.6526		

CV (%) = 87,335.

Tabela 18A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro total de espermatozóides corados

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	31805.55			
Total de resíduo	41	16744.00	408.3902	1,03	0,4644
BODE	3	2536.450	845.4833	2,78	0,0542
Erro A	16	4866.600	304.1625		
Diluyente	1	1445.000	1445.000	6,53	0,0147
Erro B	19	4201.500	221.1316		
CR	1	1531.250	1531.250	3,86	0,0567
CR x diluyente	1	2163.200	2163.200	5,46	0,0249
Resíduo	38	15061.55	396.3566		

CV (%) = 87,335.

Tabela 19A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 8 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	0.9960646E+08			
Total de resíduo	41	0.5145542E+08	1255010.	0,99	*****
BODE	3	3545978.	1181993.	0,95	*****
Erro A	16	0.1993891E+08	1246182.		
Diluyente	1	1638495.	1638495.	1,30	0,2608
Erro B	19	0.2389086E+08	1257414.		
CR	1	1192429.	1192429.	0,94	*****
CR x diluyente	1	1248750.	1248750.	0,99	*****
Resíduo	38	0.4815103E+08	1267132.		

CV (%) = -1.328,0.

Tabela 20A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 16 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	75188.75			
Total de resíduo	41	63844.75	1557.189	5,22	0,0000
BODE	3	4750.550	1583.517	1,17	0,3326
Erro A	16	21589.70	1349.356		
Diluyente	1	16878.05	16878.05	27,70	0,0000
Erro B	19	11577.45	609.3395		
CR	1	5511.200	5511.200	18,46	0,0001
CR x diluyente	1	3537.800	3537.800	11,85	0,0014
Resíduo	38	11344.00	298.5263		

CV (%) = 42,530.

Tabela 21A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 24 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	73468.00			
Total de resíduo	41	58942.45	1437.621	3,76	0,0000
BODE	3	4383.100	1461.033	1,27	0,2988
Erro A	16	18422.90	1151.431		
Diluyente	1	22916.45	22916.45	49,16	0,0000
Erro B	19	8856.550	466.1342		
CR	1	4118.450	4118.450	10,77	0,0022
CR x diluyente	1	245.0000	245.0000	0,64	*****
Resíduo	38	14525.55	382.2513		

CV (%) = 56,670.

Tabela 22A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 32 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	84141.55			
Total de resíduo	41	68416.85	1668.704	4,03	0,0000
BODE	3	4295.650	1431.883	1,23	0,3136
Erro A	16	18688.90	1168.056		
Diluyente	1	29414.45	29414.45	55,00	0,0000
Erro B	19	10160.55	534.7658		
CR	1	2856.050	2856.050	6,90	0,0124
CR x diluyente	1	3001.250	3001.250	7,25	0,0105
Resíduo	38	15724.70	413.8079		

CV (%) = 56,670.

Tabela 23A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 40 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	78501.55			
Total de resíduo	41	69489.85	1694.874	7,15	0,0000
BODE	3	14672.55	4890.850	4,63	0,0074
Erro A	16	16901.00	1056.312		
Diluyente	1	22244.45	22244.45	31,03	0,0000
Erro B	19	13618.55	716.7658		
CR	1	1602.050	1602.050	6,76	0,0132
CR x diluyente	1	451.2500	451.2500	1,90	0,1758
Resíduo	38	9011.700	237.1500		

CV (%) = 54,177.

Tabela 24A – Análise de variância aplicada ao efeito das curvas de resfriamento sobre os diluentes às 48 horas de armazenamento, com relação ao parâmetro espermatozóides reativos ao teste hiposmótico

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Total	79	77325.89			
Total de resíduo	41	63609.31	1551.447	4,30	0,0000
BODE	3	1898.838	632.9458	0,43	*****
Erro A	16	23762.80	1485.175		
Diluyente	1	19065.31	19065.31	22,45	0,0000
Erro B	19	16132.44	849.0757		
CR	1	877.8125	877.8125	2,43	0,1272
CR x diluyente	1	1872.112	1872.112		
Resíduo	38	13716.58	360.9625		

CV (%) = 64,760.

APÊNDICE B

Tabela 1B – Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozóides corados após 8 horas de armazenamento, a 5° C

Variável	Variável	Observações	Correlações	T	Significância
MOTD1C1	HOD1C1	19	0,4630	2,1537	0,0230
MOTD1C1	CORD1C1	18	-0,4223	-1,8633	0,0404
MOTD1C2	HOD1C2	19	0,0954	0,3951	0,3489
MOTD1C2	CORD1C2	19	-0,5858	-2,9801	0,0042
MOTD2C1	HOD2C1	19	0,4840	2,2807	0,0179
MOTD2C1	CORD2C1	19	-0,6787	-3,8101	0,0007
MOTD2C2	HOD2C2	19	0,4488	2,0705	0,0270
MOTD2C2	CORD2C2	19	-0,2474	-1,0530	0,1535

MOT = motilidade; HO = teste hiposmótico; COR = número de espermatozóides corados; D1C1 = diluente 1 associado à CR1; D1C2 = diluente 1 associado à CR2; D2C1 = diluente 2 associado à CR1; e D2C2 = diluente 2 associado à CR2.

Tabela 2B – Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozóides corados após 16 horas de armazenamento, a 5° C

Variável	Variável	Observações	Correlações	T	Significância
MOTD1C1	HOD1C1	13	0,7913	4,2922	0,0006
MOTD1C1	CORD1C1	12	-0,9065	-6,7910	0,0000
MOTD1C2	HOD1C2	19	0,3950	1,7727	0,0471
MOTD1C2	CORD1C2	16	-0,1469	-0,5556	0,2936
MOTD2C1	HOD2C1	18	0,1100	0,4428	0,3319
MOTD2C1	CORD2C1	16	-0,0855	-0,3212	0,3764
MOTD2C2	HOD2C2	18	0,2851	1,1900	0,1257
MOTD2C2	CORD2C2	16	0,1658	0,6290	0,2697

MOT = motilidade; HO = teste hiposmótico; COR = número de espermatozóides corados; D1C1 = diluente 1 associado à CR1; D1C2 = diluente 1 associado à CR2; D2C1 = diluente 2 associado à CR1; e D2C2 = diluente 2 associado à CR2.

Tabela 3B – Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozóides corados após 24 horas de armazenamento, a 5^o C

Variável	Variável	Observações	Correlações	T	Significância
MOTD1C1	HOD1C1	9	0,5659	1,8160	0,0561
MOTD1C1	CORD1C1	11	-0,7135	-3,0548	0,0068
MOTD1C2	HOD1C2	18	0,0926	0,3719	0,3574
MOTD1C2	CORD1C2	18	-0,2864	-1,1959	0,1246
MOTD2C1	HOD2C1	17	0,3027	1,2299	0,1188
MOTD2C1	CORD2C1	17	0,0156	0,0604	0,4763
MOTD2C2	HOD2C2	18	0,1429	0,5775	0,2858
MOTD2C2	CORD2C2	19	0,2977	1,2857	0,1079

MOT = motilidade; HO = teste hiposmótico; COR = número de espermatozóides corados; D1C1 = diluente 1 associado à CR1; D1C2 = diluente 1 associado à CR2; D2C1 = diluente 2 associado à CR1; e D2C2 = diluente 2 associado à CR2.

Tabela 4B – Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de espermatozóides corados após 40 horas de armazenamento, a 5^o C

Variável	Variável	Observações	Correlações	T	Significância
MOTD1C1	HOD1C1	5	0,3955	0,7459	0,2549
MOTD1C1	CORD1C1	4	-0,8437	-2,2223	0,0782
MOTD1C2	HOD1C2	16	0,4766	2,0287	0,0310
MOTD1C2	CORD1C2	16	-0,1274	-0,4807	0,3191
MOTD2C1	HOD2C1	15	0,5148	2,1654	0,0248
MOTD2C1	CORD2C1	15	-0,7395	-3,9612	0,0008
MOTD2C2	HOD2C2	16	0,6362	3,0853	0,0040
MOTD2C2	CORD2C2	16	-0,8608	-6,3287	0,0000

MOT = motilidade; HO = teste hiposmótico; COR = número de espermatozóides corados; D1C1 = diluente 1 associado à CR1; D1C2 = diluente 1 associado à CR2; D2C1 = diluente 2 associado à CR1; e D2C2 = diluente 2 associado à CR2.

Tabela 5B – Correlações entre motilidade, teste hiposmótico e número de f a 5° C

Variável	Variável	Observações	Correlações	T	Significância
MOTD1C1	HOD1C1	6	0,9035	4,2150	0,0068
MOTD1C1	CORD1C1	5	-0,5935	-1,2773	0,1457
MOTD1C2	HOD1C2	18	0,5869	2,8996	0,0052
MOTD1C2	CORD1C2	17	-0,1370	-0,5356	0,3000
MOTD2C1	HOD2C1	15	0,3679	1,4266	0,0886
MOTD2C1	CORD2C1	16	-0,5183	-2,2674	0,0199
MOTD2C2	HOD2C2	16	-0,0714	-0,2679	0,3963
MOTD2C2	CORD2C2	17	0,1532	0,6004	0,2786

MOT = motilidade; HO = teste hiposmótico; COR = número de espermatozoides corados; D1C1 = diluente 1 associado à CR1; D1C2 = diluente 1 associado à CR2; D2C1 = diluente 2 associado à CR1; e D2C2 = diluente 2 associado à CR2.