



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, SOCIAIS E AGRÁRIAS  
BACHARELADO EM AGROINDÚSTRIA**

**SHARA CRISTINA DA SILVA LIMA**

**AVALIAÇÃO DO USO DA GEMA DE OVO DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E  
GALINHA-D'ANGOLA (*Numida meleagris*) EM DIFERENTES PROPORÇÕES NA  
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES CAPRINO**

**BANANEIRAS – PB**

**2024**

**SHARA CRISTINA DA SILVA LIMA**

**AVALIAÇÃO DO USO DA GEMA DE OVO DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E GALINHA-D'ANGOLA (*Numida meleagris*) EM DIFERENTES PROPORÇÕES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES CAPRINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Agroindústria da Universidade Federal da Paraíba, em atendimento às exigências para obtenção do Grau de Bacharel em Agroindústria.

**Área de Conhecimento:** Produção e Reprodução Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente

**Coorientador:** Dr. Michele Flávia Sousa Marques

BANANEIRAS - PB

2024

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L732a Lima, Shara Cristina da Silva.

Avaliação do uso da gema de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*) e galinha-d'angola (*Numida meleagris*) em diferentes proporções na criopreservação de espermatozoides caprino / Shara Cristina da Silva Lima. - Bananeiras, 2024.

39 f. : il.

Orientação: Carlos Augusto Alanis Clemente.

Coorientação: Michele Flávia Sousa Marques.

TCC (Graduação) - UFPB/CCHSA.

1. Biotecnologia. 2. Caprinocultura. 3. Espermatozoides. I. Clemente, Carlos Augusto Alanis. II. Marques, Michele Flávia Sousa. III. Título.

UFPB/CCHSA-BANANEIRAS

CDU 338.43

**SHARA CRISTINA DA SILVA LIMA**

**AVALIAÇÃO DO USO DA GEMA DE OVO DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E GALINHA-D'ANGOLA (*Numida meleagris*) EM DIFERENTES PROPORÇÕES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES CAPRINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Agroindústria do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, em atendimento às exigências para a obtenção do Grau de Bacharel em Agroindústria.

Data: 30/01/2024

Resultado: 9,7

Comissão Examinadora

Documento assinado digitalmente



**CARLOS AUGUSTO ALANIS CLEMENTE**

Data: 31/01/2024 21:28:30-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr Carlos Augusto Alanis Clemente

CCHSA/DCA

Orientador

Documento assinado digitalmente



**MICHELE FLAVIA SOUSA MARQUES**

Data: 31/01/2024 22:34:52-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Michele Flávia Sousa Marques

CCHSA

Coorientadora

MARCOS PAULO

CARRERA

MENEZES:71665358572

Assinado de forma digital por MARCOS PAULO CARRERA MENEZES:71665358572  
Data: 2024.01.31 18:16:53 -03'00'

---

Prof. Dr Marcos Paulo Carrera Menezes

CCHSA/DCA

Examinador

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Fabiana Augusta Santiago Beltrão

CCHSA/DGTA

Examinador

BANANEIRAS - PB

2024

*“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”. (Los Hermanos)*

## AGRADECIMENTOS

Ao fim dessa jornada gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus por todos obstáculos vencidos e a todas as pessoas que tornaram este trabalho possível:

À minha Mãe Lucineide, Meu Pai Josenaldo, minha Tia Elayne, meu Tio Jailson, Meu avô Manoel e minha avô Maria do Carmo, que mesmo já não estando entre nós foi o meu maior alicerce e incentivadora de ir em busca dos meus sonhos através dos estudos. Obrigada minha família, por todo o apoio incondicional, paciência e compreensão durante este período. Seu amor e encorajamento foram essenciais para minha jornada acadêmica. Vocês são a parte mais linda da minha vida e tudo que sou e serei dedico a vocês.

Ao meu orientador/professor Carlos Augusto, pela orientação, suporte e dedicação ao longo deste processo. Seu conhecimento e orientação foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho e formação acadêmica.

A Michele Flávia por todo suporte, incentivo e paciência durante o processo.

A João Victor por todo seu amor e compreensão, em nunca soltar minha mão e sempre apoiar minhas decisões.

Aos amigos e colegas que compartilharam suas experiências, ideias e apoio ao longo desta jornada. Suas contribuições foram inestimáveis para o desenvolvimento deste trabalho, em especial Gilmaria Marinho e Alcineide Moraes. Vocês são provas vivas que não podemos fazer nada sozinhos nessa vida, é sempre bom ter com quem contar.

Aos senhores Gerson, Alex, Seu Lucas e Gerson da Caprino, por todo apoio emocional, físico e mental. Vocês foram meus braços e minhas pernas ao longo desse período, a amizade fraterna de vocês levarei sempre no meu coração aonde quer que eu vá.

Agradeço também a todas as instituições e em especial ao Laboratório de Caprinovinocultura, vocês me fizeram me sentir em casa! Gratidão.

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização da gema de ovo de diferentes espécies de aves: galinha (*Gallus gallus domesticus*) e galinha-d'angola (*Numida meleagris*), nas proporções de 10%, 15% e 20%, em protocolos de criopreservação de espermatozoides da espécie caprina. Foram coletados seis ejaculados de 4 caprinos das raças Saanen e Alpina, duas vezes por semana, durante três semanas consecutivas. Após a colheita e formação do pool seminal, o sêmen foi dividido em seis alíquotas, centrifugado a 600 g por 10 minutos e ressuscitado diretamente nos meios testes, ajustado para concentração final de 400 milhões de spz/mL, envasado em palhetas de 0,25 mL, refrigerado em geladeira e congelado em vapor de nitrogênio, utilizando curvas testadas e padronizadas. Imediatamente após a formação do pool seminal, após a diluição do sêmen e após o congelamento, foram realizadas as avaliações de motilidade, vigor, teste de integridade estrutural e funcional das membranas espermáticas e a morfologia espermática. Foi verificada influência do processamento do sêmen ( $p < 0,05$ ) com redução gradativa no percentual de motilidade, no vigor, nos percentuais de células com integridade estrutural e funcional das membranas, bem como no percentual de espermatozoides morfolologicamente normais em todas as etapas (in natura, pós-diluição e pós-congelamento). Já entre os tratamentos, não foi verificada influência ( $p > 0,05$ ) da espécie de ave utilizada como fornecedora de gema (galinha e galinha d'angola), nem entre as proporções de gema utilizadas, em todas as etapas nas avaliações realizadas. Concluímos que é possível realizar a substituição da gema de ovo de galinha pela gema de ovo da galinha-d'angola em protocolos de criopreservação de sêmen caprino.

**Palavras-chave:** Biotecnologia. Caprinocultura. Espermatozoides.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the use of egg yolk from different bird species: hen (*Gallus gallus domesticus*) and guinea fowl (*Numida meleagris*), in proportions of 10%, 15% and 20%, in protocols of caprine sperm cryopreservation. Six ejaculates from 4 Saanen and Alpine goats were collected twice a week for three consecutive weeks. After collection and formation of the seminal pool, the semen was divided into six aliquots, centrifuged at 600 g for 10 minutes and resuspended directly in the test media, adjusted to a final concentration of 400 million spz/mL, packaged in straws of 0.25 mL, refrigerated and frozen in nitrogen vapour, using tested and standardized curves. Immediately after the formation of the seminal pool, after semen dilution and after freezing, evaluations of motility, vigor, test of structural and functional integrity of sperm membranes and sperm morphology were performed. The influence of semen processing ( $p < 0.05$ ) was verified, with a gradual reduction in the percentage of motility, in vigor, in the percentage of cells with structural and functional integrity of the membranes, as well as in the percentage of morphologically normal spermatozoa in all stages (in natura, post-dilution and post-freezing). Between treatments, there was no influence ( $p > 0.05$ ) of the bird species used as yolk supplier (hen and guinea fowl), nor between the proportions of yolk used, in all stages of the evaluations performed. We conclude that it is possible to replace chicken egg yolk with guinea fowl egg yolk in goat semen cryopreservation protocols.

**Keywords:** Biotechnology. Goat farming. Sperm.

## LISTA DE ABREVIACOES

CCHSA – Centro de Ciência Humanas Sociais e Agrárias

CBRA – Colégio Brasileiro de Reproduo Animal

DMSO – Dimetilsulfóxido

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

HOST – Teste Hiposmtico

LARA – Laboratório de Reproduo Animal

0H – Logo após o congelamento

2H – 2 horas após o congelamento

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

TGG – Tris gema galinha

TGGN – Tris gema galinha d’angola

TTR – Teste de termo resistência

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diluidores prontos .....	22
<b>Figura 2.</b> Coleta de sêmen caprino.....	23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Descrição dos grupos experimentais .....	22
<b>Tabela 2.</b> Percentual de células espermáticas móveis (motilidade) de caprinos, antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de diferentes espécies em diferentes proporções	26
<b>Tabela 3.</b> Vigor das células espermáticas caprina antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de galinha e galinha-d'angola em diferentes proporções .....	27
<b>Tabela 4.</b> Percentual da integridade de membrana plasmática das células espermáticas caprina antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de diferentes espécies em diferentes proporções .....	28
<b>Tabela 5.</b> Percentual da viabilidade bioquímica da membrana plasmática baseando-se nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico, das células espermáticas caprina antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de diferentes espécies em diferentes proporções .....	30
<b>Tabela 6.</b> Percentual de células espermáticas morfológicamente normais encontradas antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de diferentes espécies em diferentes proporções .....	31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>16</b>
3.1 CAPRINOCULTURA NO BRASIL.....	16
3.2 CRIOPRESERVAÇÃO .....	17
3.3 DILUIDORES .....	18
3.4 CENTRIFUGAÇÃO .....	19
3.5 GEMA DE OVO NA CRIOPRESERVAÇÃO .....	20
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>21</b>
4.1 LOCALIZAÇÃO .....	21
4.2 ANIMAIS E MANEJO .....	21
4.3 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DILUIDORES .....	21
4.4 COLETA DE SÊMEN .....	23
4.5 PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO SEMINAL .....	24
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade pecuária devido à sua maior aptidão para se adaptar a condições de seca, representa uma das mais importantes atividades do agronegócio no semiárido brasileiro e tem se desenvolvido num dos principais fatores para a garantia da segurança alimentar das famílias rurais, geração de emprego e renda local (Lima, 2009). Considerando que 92% do rebanho caprino nacional se concentra na Região Nordeste, a importância da caprinocultura para a economia da região é cada vez mais evidente. Nesse contexto, a caprinocultura no Brasil vem se consolidando como atividade rentável, que não requer muitos investimentos ou grandes áreas para seu desenvolvimento.

Ao longo do tempo, o estudo da reprodução dos mamíferos, em geral, tem sido de grande relevância e importância para a produção animal (Hafez; Hafez, 2004). A pesquisa fundamental e o conhecimento da regularização da atividade reprodutiva levaram ao desenvolvimento de técnicas de manejo apropriadas para um melhor desempenho dos animais, bem como, de métodos de reprodução assistida que visam aumentar o número de crias viáveis, saudáveis e com melhor qualidade genética (Freitas *et al.*, 1997).

A criopreservação do sêmen é a principal técnica voltada à preservação animal fora do seu ambiente natural. O sêmen pode ser coletado por vários métodos, mas principalmente pelas técnicas de eletroejaculação, massagem retal e vagina artificial (Trounson, 1998). O advento do sêmen congelado trouxe uma nova dimensão para a inseminação artificial, viabilizando de forma maximizada, o melhoramento genético dos rebanhos, justamente pela capacidade de aumentar as progênes por macho em diversos lugares simultaneamente, além de criar a fácil possibilidade de manipulação e armazenamento de material genético (Leboeuf *et al.*, 2000).

Em meio as biotecnologias aplicadas a reprodução animal, as técnicas aplicadas ao sêmen são as mais utilizadas, principalmente nas espécies bovina, caprina e ovina. Uma vez que o sêmen é utilizado para a realização praticamente de todas as outras biotecnologias reprodutivas, como por exemplo, a produção *in vitro* de embriões, produção *in vivo* de embriões, inseminação artificial e entre outras (Qin *et al.*, 2018).

Com isso, os diluidores usados para a preservação espermática, de uma forma geral, devem ter pH adequado, capacidade de proteção e manutenção da viabilidade celular, osmolaridade adequada e, ainda, capacidade de proteger o espermatozoide de injúrias criogênicas (Salamon; Maxwell, 2000).

Além disso, é importante destacar que a seleção de um meio diluente adequado é

fundamental para proteger as células espermáticas durante a criopreservação. Por essa razão, esses meios são compostos por elementos essenciais, como fontes de energia, soluções tampão e agentes que previnem danos causados pelo congelamento (Cavalcante *et al.*, 2014).

Por isso, a busca por meios diluentes mais eficientes, que incluam ingredientes criteriosamente selecionados, tem sido alvo de intensas pesquisas científicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de gema de ovo galinha (*Gallus gallus domesticus*) e galinha-d'angola (*Numida meleagris*) com diferentes proporções em protocolos de criopreservação de espermatozoides da espécie caprina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir qual a melhor proporção de gema de ovo (10%, 15% ou 20%) em diluidor TRIS-Gema para caprino;
- Avaliar qual gema de ovo, galinha (*Gallus gallus domesticus*) ou galinha-d'angola (*Numida meleagris*) preserva melhor a integridade e a funcionalidade das membranas plasmáticas do espermatozoide caprino pós-descongelamento;
- Avaliar se a substituição da gema de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*) pela gema de ovo de galinha-d'angola (*Numida meleagris*) melhora a sobrevivência dos espermatozoides caprinos congelado e descongelado.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 CAPRINOCULTURA NO BRASIL

De acordo com FAO (2016), em 2014 o rebanho mundial de caprinos era da ordem de 1,06 bilhão de cabeças. Os caprinos estão distribuídos por todos os continentes do planeta. No entanto, percebe-se uma maior concentração de caprinos nos países em desenvolvimento. Com a evolução do rebanho nos últimos 5 anos, é possível observar uma taxa de crescimento anual da ordem de 1%, apontando para pequenas mudanças deste cenário em 2016. Já o rebanho mundial de ovinos era da ordem de 1,2 bilhão de cabeças em 2014, distribuído em todos os continentes.

Segundo Figueiredo (1981), citado por Maia (1994), a caprinocultura foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses, juntamente com os primeiros animais domésticos por volta do ano 1535. Até o início da década de 70, o rebanho caprino brasileiro era composto por animais sem raça definida. Em 1975, foi realizada a primeira importação de caprinos leiteiros para o Brasil. Na década de 80 houve a entrada de grandes empresários que fizeram investimentos importantes para o setor. Nos anos 90, foram criados programas estaduais para compra e distribuição do leite de cabra a crianças carentes no Rio Grande do Norte e na Paraíba (Fonseca; Bruschi, 2009).

Essas iniciativas foram de suma importância para o desenvolvimento da caprinocultura leiteira no Brasil. Apesar do ainda baixo nível tecnológico presente em todo processo produtivo, a Caprinocultura no Brasil, principalmente no Nordeste, tem apresentado formas que a coloca numa posição estratégica no cenário do agronegócio e nos programas sociais de combate a pobreza no campo. Entretanto, atualmente, a produção destes pequenos ruminantes vem se caracterizando como uma atividade de grande importância cultural, social e econômica para a região, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento do Nordeste. De acordo com Moraes Neto et al. (2003), a caprinovinocultura representa uma boa alternativa de trabalho e renda, visto a produção de alimentos de alto valor biológico (leite, carne e vísceras), bem como de pele de excelente qualidade, além da adaptabilidade dos animais aos ecossistemas locais. Embora, segundo os autores, em virtude do elevado grau de incertezas e riscos, a pecuária nordestina torna-se dependente de uma reformulação dos modelos tradicionais de planejamento e administração. Isto está respaldado no incremento do consumo interno de carne, leite e da demanda dos curtumes por peles de qualidade, bem como na percepção de oportunidades de negócio que a atividade tem oferecido. De acordo com o censo

agropecuário de 2006 (BRASIL, 2009), o rebanho caprino brasileiro é da ordem de 7.107.608 cabeças, estando concentrado na região Nordeste (91%), onde são criados, na sua maioria, sob sistemas de produção poucos tecnificados, utilizando animais com baixo potencial genético para atender as exigências do mercado consumidor em termos de regularidade e qualidade

### 3.2 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma ferramenta importante para a conservação dos recursos genéticos. No entanto, essa biotécnica pode causar danos às células espermáticas, especialmente durante o congelamento, determinando alterações letais ou subletais nos espermatozoides em níveis ultraestruturais, bioquímicos e funcionais, que resultam na redução da motilidade, viabilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides (Alcay *et al.*, 2020).

Um progressivo crescimento no interesse em técnicas que possam possibilitar um maior aproveitamento do material genético oriundo de reprodutores de diferentes espécies vem sendo observado ao longo dos anos. Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, o grande destaque vem sendo a criopreservação de sêmen, pois possibilita um melhor aproveitamento de ejaculados oriundos de um mesmo reprodutor, bem como facilita a propagação deste material genético para diferentes regiões do planeta, mesmo após a morte do animal (Silva *et al.*, 2001).

A criopreservação tem como princípio a redução da temperatura, reduzindo o metabolismo celular e permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, permitindo a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento adequado (PEGG, 2007). Que Segundo Watson (2000), a complexibilidade do processo de criopreservação de sêmen é uma das grandes problemáticas e dependem de uma série de fatores que contribuem para o sucesso da biotécnica. Dentre esses fatores, destacam-se a qualidade inicial da amostra seminal colheita, a diluição submetida, concentração, diluente e a técnica de criopreservação utilizada.

Todavia, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen fresco. Este prejuízo surge da combinação de dois aspectos, a morte celular e danos na capacidade funcional dos espermatozoides sobreviventes (Watson, 2000).

A motilidade e a estrutura dos espermatozoides são afetadas de diferentes formas, uma vez que ocorrem injúrias simultaneamente ou nas diferentes etapas da criopreservação

(Gonzales, 2004). As injúrias ocorridas nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides, ocasionadas pelo processo de criopreservação, são devido a alterações na temperatura e na osmolaridade do meio que provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios das membranas dos espermatozoides (Celeghini, 2005). Tal biotecnologia, quando associada à inseminação artificial, representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de excelente qualidade (Castelo *et al.*, 2008).

### 3.3 DILUIDORES

Para um diluidor conservação espermática ser considerado como ideal ele deve possuir uma substância orgânica que atue como crioprotetor externo, como a gema de ovo ou leite desnatado já que a fosfatidilcolina (lecitina) e as lipoproteínas da gema e a caseína do leite protegem os espermatozoides durante a refrigeração, contra o choque térmico que se produz ao refrigerar o sêmen desde os 20°C aos 5°C (Mies Filho *et al.*, 1982; Das; Rajkonwar, 1995); uma fonte de energia, como a glicose ou frutose; um componente tampão, como citrato de sódio ou hidroximetil aminometano (TRIS); um crioprotetor interno que proteja os espermatozoides durante o congelamento, a exemplo do glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol; e antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano, como penicilina, estreptomicina ou gentamicina (Evans; Maxwell, 1987).

Os diluidores possibilitam o aumento do volume seminal, permitindo seu fracionamento, exercem papel fundamental na preservação do sêmen, tanto no processo de refrigeração quanto no de congelamento (Salamon; Maxwell, 2000). Segundo Sakashita 2012, é muito importante a escolha de um bom diluente, onde este deve ser atóxico para os espermatozoides, ser de baixo custo, preparo fácil e ter pH e pressão osmótica compatíveis com a sobrevivência espermática, inibir o crescimento bacteriano sendo fundamental na conservação, pois deverá conter substâncias que ao mesmo tempo proporcionem aporte nutricional e proteção às células contra o choque térmico que ocorrem durante as curvas de refrigeração.

O sêmen caprino apresenta particularidades que o diferencia do sêmen de outras espécies. A mais importante é característico do sêmen caprino a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbo uretrais, liberadas no plasma seminal (Simplício; Machado, 1989). O plasma seminal dos caprinos é rico em fosfolipase A, que ao interagir com os fosfolipídios da maioria dos diluidores, catalisa a hidrólise de lecitina presente na gema de ovo e liberam ácidos graxos e lisolecitinas, responsáveis pela ação detergente sobre os lipídios da membrana

plasmática que são altamente tóxicos para os espermatozóides (Ammdal *et al.*, 1965; Corteel, 1974; Iritani; Nishikawa, 1961; Roy, 1957).

Ao se utilizar sêmen caprino na criopreservação, ocorre à redução do número de espermatozóides vivos sendo diretamente proporcional ao tempo de armazenamento e a remoção do plasma seminal pela centrifugação imediatamente após a coleta do sêmen, antes do congelamento, mostrou ser benéfica à sobrevivência das células espermáticas pós-descongelamento em vários trabalhos (Corteel 1974; Holtz, 1994; Lebouef, 2000; Ritar; Salamon, 1982; Tuli; Machado; Simplício, 1995).

### 3.4 CENTRIFUGAÇÃO

A centrifugação é um procedimento que permite obter fração concentrada em espermatozoides, além de eliminar o plasma seminal, que segundo Amann; Pickett, (1987) não contribui na preservação da viabilidade espermática durante o processo de congelamento. O sêmen de caprino, contém na composição enzima (fosfolipase A) e lipoproteína (SBUIII), que são secretadas pelas glândulas bulbouretrais, e são capazes de reagir com lipídeos presente na gema de ovo e leite, que são substâncias muito comuns em meios de criopreservação (Borges *et al.*, 2020).

Contudo, a força de centrifugação influencia na integridade do acrossoma e membrana plasmática do espermatozoide, bem como no potencial cinético, com efeitos na interação do espermatozoide com o oócito, na fertilização e na produção de embriões (Machado *et al.*, 2009).

Com o plasma seminal rico em fosfolipase A, o sêmen caprino consegue interagir com os fosfolipídios dos diluidores gerando substâncias espermicidas (Roy, 1957). Logo, se faz necessário remoção do plasma seminal, para evitar possíveis reações nocivas aos componentes seminal e a interação negativa com os meios diluidores convencionais (Purdy, 2006; Bezerra, 2010).

Por esse motivo, a centrifugação é o método convencional capaz de superar as interações prejudiciais do plasma seminal e junto com as proteínas da gema de ovo ou do leite, é recomendado a diluição da amostra de sêmen em um diluente tamponado, para poder separar o plasma seminal do espermatozoide através de centrifugação (Purdy, 2006).

Para minimizar os efeitos da centrifugação, recomenda-se o uso de pré-diluidores, velocidade e tempo adequados, capazes de garantir proteção às células espermáticas durante este processo (Neves, 2008). E mesmo assim, segundo Câmara (2018) o método de centrifugação atua na separação do plasma seminal e pode gerar estresse nas células, diminuindo a motilidade e aumentando as patologias.

### 3.5 GEMA DE OVO NA CRIOPRESERVAÇÃO

A adição da gema do ovo aos meios diluidores tem mostrado aumento dessa habilidade e capacidade em proteger os espermatozoides contra os danos causados pelo resfriamento e congelamento. Várias pesquisas vem sendo destinadas a entender o mecanismo de proteção exercido pela gema de ovo, bem como descobrir qual é o componente responsável por esse processo, mas ainda pouco se sabe sobre o assunto. Dentre esses componentes, as lipoproteínas de baixa densidade, primeiramente isoladas por Mayer; Lasley em 1945, têm sido apontadas como as responsáveis pelo efeito crioprotetor da gema de ovo (Watson, 1981a).

O diluente Tris-gema contém como tampão o tris ( $C_4H_{11}NO_3$ ), glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo para proteger a membrana contra o choque térmico (Evans; Maxwell, 1987). Durante o choque térmico, os fosfolipídios presentes na gema interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e proporcionam a proteção da mesma. As lipoproteínas ligam-se à membrana da célula espermática e ajudam a preservar a integridade celular durante o armazenamento (Bouchard *et al.*, 1990).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 LOCALIZAÇÃO

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Reprodução Animal (LARA) e Caprinocultura e Ovinocultura, ambos localizados no Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, Paraíba, Brasil.

### 4.2 ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizados quatro caprinos reprodutores de raças leiteiras (Saanen e Alpina) como doadores de sêmen, com cerca de cinco anos de idade e pesando em média 67 kg., e duas cabras da raça Saanen, foram utilizadas como manequins, com cerca de quatro anos de idade e pesando em média 50 kg.

Os animais foram mantidos em baias individuais, recebendo alimentação, água e mistura mineral completa, visando suprir os requerimentos de manutenção. Os animais passaram por um período de adaptação de aproximadamente 30 dias do período experimental, onde foram submetidos a regime de colheita de sêmen e avaliações clínico-andrológicas, para comprovação de fertilidade e exclusão de patologias reprodutivas.

### 4.3 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DILUIDORES

Para a execução do presente estudo, seis diferentes diluidores foram confeccionados. Como diluidor padrão foi utilizado o TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo e 5% de glicerol conforme mostra a tabela 1. Os diluidores testes foram formados a partir das diferentes fontes de gema de ovo (galinha e galinha-d'angola) e suas diferentes proporções (10%, 15% e 20%), conforme mostra a figura 1.

O diluidor padrão TRIS-frutose-ácido cítrico é composto de acordo com a formulação proposta por Hafez e Hafez (2004), com: 3,605g de TRIS (hidroximetil) aminometano; 2,024g de ácido cítrico; 1,488g de frutose, 25mg de Gentamicina, 100mL de água destilada. Havendo modificação apenas no antibiótico, o qual foi utilizado a penicilina em sua composição.

**Tabela 1.** Descrição dos grupos experimentais.

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Concentração/Descrição</b>
<b>TRIS + 10% TGG</b>	TRIS + 10% gema de ovo de Gallus gallus domesticus
<b>TRIS + 15% TGG</b>	TRIS + 15% gema de ovo de Gallus gallus domesticus
<b>TRIS + 20% TGG</b>	TRIS + 20% gema de ovo de Gallus gallus domesticus
<b>TRIS + 10% TGGN</b>	TRIS + 10% gema de ovo de Numida meleagris
<b>TRIS + 15% TGGN</b>	TRIS + 15% gema de ovo de Numida meleagris
<b>TRIS + 20% TGGN</b>	TRIS + 20% gema de ovo de Numida meleagris

TGG: gema de ovo de Galus gallus domesticus. TGGN: gema de ovo de Numida meleagris. TRIS: hidroximetil aminometano. %: percentual.

**Fonte:** Autora.

**Figura 1:** Diluidores prontos.

**Fonte:** Autora.

#### 4.4 COLETA DE SÊMEN

Foram realizadas colheitas de quatro reprodutores da espécie caprina para formação de um *pool* seminal, para minimizar os efeitos individuais sobre a amostra. Uma cabra em estro induzido foi utilizada durante as colheitas, conforme mostra a figura 2. As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de vagina artificial, duas vezes por semana, durante três semanas seguidas, totalizando seis ejaculados por animal, para formação de seis *pools* seminais.

Após cada colheita, o ejaculado foi protegido da incidência direta de luz solar, transportado ao Laboratório de Reprodução Animal do CCHSA/UFPB, e avaliados de acordo com o Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013; Quin *et al.*, 2018).

**Figura 2.** Coleta de sêmen caprino.



**Fonte:** Autora.

#### 4.5 PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO SEMINAL

Após a formação do pool seminal, o sêmen foi dividido em seis amostras, que foram diluídas em Solução de Ringer com Lactato (Equiplex-R) na proporção de 1:9. Após a diluição, as amostras foram levadas à centrífuga para remoção do plasma por 10 minutos a 600 g de força. Sendo posteriormente, retirados todos os sobrenadantes e então os “pellets” foram suspendidos e pré-diluídos já nos meios diluidores a serem testados (até 2,0 mL).

Foram realizadas as determinações das concentrações espermáticas das amostras ajuste nas diluições, obtendo-se ao final, uma concentração de 400 milhões de espermatozoides/mL. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e refrigerado em geladeira utilizando a curva de resfriamento caracterizada por Bispo (2005), testada e padronizada.

Após a curva de resfriamento, as palhetas foram mantidas por mais uma hora (1h) na temperatura de 5°C, sendo realizada posteriormente a curva de congelamento em vapor de nitrogênio, onde as palhetas foram colocadas a cinco centímetros (5 cm) acima da fase líquida do nitrogênio e mantidas por 15 minutos. Posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e preservadas no mesmo por um período mínimo de uma semana, antes de serem descongeladas.

Depois de descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, as amostras foram retiradas das palhetas, colocadas em tubos plásticos tipo eppendorf e mantidas em banho-maria para avaliação.

As amostras do *pool* espermático e do sêmen diluído em cada tratamento e em cada tempo distinto (antes e após o congelamento/descongelamento) foram avaliadas quanto a motilidade espermática (percentual de células móveis), o vigor espermático (intensidade de deslocamento), a integridade estrutural (dupla coloração com eosina-nigrosina) e funcional da membrana espermática (teste hiposmótico), além da morfologia (percentual de células espermáticas morfolologicamente normais).

#### 4.6 ANALÍSE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar a influência dos grupos sobre os parâmetros avaliados e quando ocorreram interferência, o teste Tukey foi realizado para identificação das diferenças entre médias, todos com significância de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das médias de motilidade espermática durante diferentes estágios do processo de congelamento do sêmen caprino é apresentada na Tabela 2. Os resultados indicam que a motilidade espermática, representativa da habilidade dos espermatozoides em realizar movimentos coordenados e eficazes, não apresentou alterações significativas ( $p>0,05$ ) em resposta aos tratamentos testados, que consistiram na adição de gema de ovo de galinha e galinha d'angola em proporções de 10%, 15% e 20%.

Observou-se uma média de 84,3% de motilidade após a diluição final, enquanto as médias imediatamente após o descongelamento e após duas horas de incubação a 37,0 °C (TTR) foram de 62,6% e 32,6%, respectivamente. Resultados esses que se assemelham aos encontrados por Marco Jiménez et al.(2004) que não encontrou diferenças nos parâmetros da motilidade espermática após congelação do sêmen em diluidores com concentrações de 10%, 15%, 20% de gema de ovo de galinha.

**Tabela 2** – Percentual de células espermáticas móveis (motilidade) de caprinos, antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de diferentes espécies em diferentes proporções.

Tratamento	Pool (%)	Diluído (%)	Pós-Congelamento	
			0h (%)	2h (%)
TGG-10	96,0 ± 1,5	86,7 ± 4,1	59,2 ± 13,2	32,5 ± 19,2
TGG-15		86,7 ± 2,6	61,7 ± 08,8	38,5 ± 19,8
TGG-20		86,7 ± 4,1	70,0 ± 10,0	37,7 ± 19,0
TGGN-10		77,5 ± 5,2	63,3 ± 16,0	30,0 ± 16,1
TGGN-15		84,2 ± 4,9	65,8 ± 15,6	34,2 ± 19,6
TGGN-20		84,2 ± 5,8	55,8 ± 11,6	22,5 ± 17,2
<b>Média</b>		84,3 ± 4,5 <sup>A</sup>	62,6 ± 12,5 <sup>B</sup>	32,6 ± 18,5 <sup>C</sup>

TGG-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol.; TGGN-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.

**Fonte:** Autora.

Embora não tenham sido identificadas disparidades significativas na motilidade espermática entre os tratamentos avaliados, constatou-se uma redução média expressiva de 21,7% na motilidade espermática antes e após o ciclo de congelamento/descongelamento. Esta redução é inerente aos processos de criopreservação do sêmen, influenciada por diversos fatores como a formação de cristais de gelo, variações osmóticas e a manifestação de estresse oxidativo

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados da avaliação do vigor das células espermáticas, que corresponde à capacidade dos espermatozoides de manterem um nível contínuo de motilidade e funcionalidade ao longo do tempo. Este estudo constatou que, mais uma vez, a classificação atribuída ao vigor espermático não foi afetada ( $p > 0,05$ ) pelos diferentes tratamentos testados.

**Tabela 3** – Vigor das células espermáticas caprina antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de galinha e galinha-d'angola em diferentes proporções.

Tratamento	Pool (%)	Diluído (%)	Pós-Congelamento	
			0h (%)	2h (%)
TGG-10	4,5 ± 0,5	3,7 ± 0,5	3,0 ± 0,9	2,0 ± 0,6
TGG-15		3,5 ± 0,5	3,3 ± 0,5	2,0 ± 0,6
TGG-20		3,5 ± 0,5	3,0 ± 0,6	2,2 ± 0,8
TGGN-10		3,2 ± 0,8	3,2 ± 0,4	1,8 ± 0,8
TGGN-15		3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,4	1,8 ± 0,4
TGGN-20		3,3 ± 0,5	2,7 ± 0,8	1,7 ± 0,8
<b>Média</b>		3,4 ± 0,5 <sup>A</sup>	3,1 ± 0,6 <sup>A</sup>	1,9 ± 0,7 <sup>B</sup>

TGG-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol.; TGGN-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.

**Fonte:** Autora.

As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) também foram observadas tanto antes do processo de congelamento quanto após o período de TTR (2 horas), com médias correspondentes de (3,4%, 3,1% e 1,9%). Todas as amostras descongeladas atenderam aos critérios estabelecidos para sêmen descongelado, excedendo os requisitos mínimos estipulados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) para os parâmetros de motilidade ( $>30\%$ ) e vigor ( $>2$ )

em espermatozoides caprinos congelados.

A integridade da membrana plasmática das células espermáticas é um aspecto crítico para a função e a viabilidade dos espermatozoides, sua avaliação é realizada por meio de testes de coloração com corantes vitais, os quais se ligam às células com membranas comprometidas, tornando-as coradas, enquanto que as células com membranas intactas permanecem incolores. Sendo assim de grande importância para a capacidade dessas células de penetrarem o óvulo e fertilizá-lo. Espermatozoides com membranas comprometidas podem ter dificuldades em completar esse processo com sucesso.

Na Tabela 4 estão os resultados referentes ao percentual de células espermáticas viáveis estão detalhados na Tabela 4 deste estudo. Nela, foi observada uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias do percentual de células viáveis antes (93,8%) e após (57,1%) o ciclo de congelamento/descongelamento.

**Tabela 4** – Percentual da integridade de membrana plasmática das células espermáticas caprina antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de diferentes espécies em diferentes proporções.

Tratamento	Pool (%)	Diluído (%)	<u>Pós-Congelamento</u>
			0h (%)
TGG-10	96,3 ± 1,7	93,8 ± 3,6	60,1 ± 10,0
TGG-15		93,9 ± 3,3	58,2 ± 7,4
TGG-20		94,5 ± 3,0	58,5 ± 9,5
TGGN-10		93,1 ± 3,5	55,1 ± 10,5
TGGN-15		93,8 ± 3,8	57,4 ± 11,0
TGGN-20		93,6 ± 4,0	53,4 ± 9,7
Média		93,8 ± 3,5 <sup>A</sup>	57,1 ± 9,7 <sup>B</sup>

TGG-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol.; TGGN-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.

**Fonte:** Autora.

Mais uma vez, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos testados, antes ou após o processo de congelamento/descongelamento. O processo de congelamento/descongelamento é desafiador para as células, incluindo os espermatozoides, devido às mudanças nas propriedades físicas da água e à formação de cristais de gelo. Esses fatores podem ter impactos na estrutura das membranas celulares, resultando em danos potenciais. No presente estudo, este processo reduziu o número de células espermáticas viáveis em 36,7% em média.

A integridade funcional da membrana plasmática está diretamente relacionada à capacidade das células espermáticas de regular seu conteúdo interno, trocar substâncias com o ambiente externo e resistir às mudanças nas condições osmóticas. Quando as células espermáticas são submetidas a mudanças rápidas nas concentrações de solutos, isso pode levar a problemas como desidratação ou inchaço excessivo, que podem comprometer a estrutura e a funcionalidade das células, logo, pode-se considerar funcionais aquelas com cauda enrolada, pois as membranas funcionais absorvem a água do meio, resultando no ingurgitamento da cauda do espermatozoide, e não-funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada (Fagundes *et al.*, 2010).

Na Tabela 5 estão os resultados do teste hiposmótico realizados antes e após o descongelamento do presente estudo, resultando em médias respectivas de 93,3% e 90,6% de suas membranas funcionais, em outras palavras, uma membrana que está "intacta", completa e que não apresenta danos ou rupturas em sua estrutura.

**Tabela 5** – Percentual da viabilidade bioquímica da membrana plasmática baseando-se nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico, das células espermáticas caprina antes e após o congelamento em diluidor tris- gema de diferentes espécies em diferentes proporções.

Tratamento	Pool (%)	Diluído (%)	Pós-Congelamento
			0h (%)
TGG-10	93,6 ± 1,6	93,5 ± 1,7	87,5 ± 5,9
TGG-15		93,3 ± 2,0	89,7 ± 3,5
TGG-20		93,1 ± 1,0	89,7 ± 4,1
TGGN-10		92,8 ± 0,9	92,1 ± 2,8
TGGN-15		93,5 ± 1,1	92,5 ± 2,8
TGGN-20		93,5 ± 1,3	92,2 ± 3,0
Média		93,3 ± 1,3 <sup>A</sup>	90,6 ± 3,6 <sup>B</sup>

TGG-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol.; TGGN-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.

**Fonte:** Autora.

A integridade da membrana é essencial para a função e a sobrevivência das células, pois ela controla a entrada e saída de substâncias, regula as trocas com o ambiente e mantém a estrutura celular. Tanto antes, quanto após o processo de congelamento/ descongelamento, os tratamentos não interferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) nos números percentuais de membranas

funcionais. Entretanto, nos distintos momentos aos quais as amostras foram avaliadas, ocorreu uma pequena redução significativa de 2,7% nos percentuais de células com integridade funcional da membrana.

As patologias espermáticas se referem a anormalidades ou condições que afetam a estrutura, função, quantidade ou qualidade dos espermatozoides. Essas patologias podem ter um impacto significativo na fertilidade masculina e na capacidade dos espermatozoides de fertilizarem um óvulo. Na Tabela 6, as análises de morfologia espermática não apresentarão diferença significativa dentre os tratamentos para o percentual de células morfologicamente normal.

**Tabela 6** – Percentual de células espermáticas morfologicamente normais encontradas antes e após o congelamento em diluidor tris-gema de diferentes espécies em diferentes proporções.

<b>Tratamento</b>	<b>Pool (%)</b>	<b>Diluidor (%)</b>	<b>Pós-descongelamento Oh (%)</b>
<b>TGG-10</b>	80,0 ± 4,0	70,4 ± 7,6	46,8 ± 15,4
<b>TGG-15</b>		69,5 ± 5,1	40,9 ± 20,6
<b>TGG20</b>		68,8 ± 7,1	35,3 ± 13,2
<b>TGGN-10</b>		64,8 ± 4,1	42,3 ± 12,8
<b>TGGN-15</b>		61,2 ± 6,9	36,2 ± 6,5
<b>TGGN-20</b>		63,6 ± 7,4	40,1 ± 8,4
<b>Média</b>		63,4 ± 6,3 <sup>A</sup>	40,3 ± 10,7 <sup>B</sup>

TGG-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol; TGG-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha e 5% de glicerol.; TGGN-10: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 10% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-15: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 15% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.; TGGN-20: TRIS-frutose-ácido cítrico, com 20% de gema de ovo de galinha-d'angola e 5% de glicerol.

**Fonte:** Autora.

Assim como nas demais avaliações realizadas, houve diferença significativa entre os distintos momentos do processamento seminal, onde a média do percentual de espermatozoides com morfologia normal foi de 63,4% antes do congelamento, e de 40,3% após o descongelamento, ou seja, ocorreu uma queda relevante de 23,1% de células normais, em meios as conformidades encontradas, causadas pelo congelamento e a todo o processo que as amostras foram submetidas. Os parâmetros identificados estão aquém do estabelecido pelo CBRA (2013) para a porcentagem de espermatozoides normais após o processo de congelamento, com a exigência sendo superior a 80%.

Logo, as diferentes proporções de gema de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*) por gema de ovo da galinha-d'angola (*Numida meleagris*) atribuídas ao meio, não apresentaram diferença estatísticas em suas medias, conseguindo preservar e proteger das células. Resultados de acordo com De Oliveira Paula *et al.*, (2020) conseguiu, comprovando que a análise ultraestrutural dos espermatozoides caprinos criopreservados com ACP-101c® com gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* ou com gema de ovo de *Numida meleagris*, demonstraram que ambas as constituições dos crioprotetores preservam tanto as membranas quanto às organelas espermáticas de modo satisfatório.

## 6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a substituição da gema de ovo de galinha pela gema de ovo da galinha-d'angola em protocolos de criopreservação de sêmen caprino não resultou em diferenças significativas na proteção das células espermáticas e no que diz respeito à integridade e funcionalidade das membranas espermáticas após o processo de descongelamento.

Portanto é possível substituir a gema de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*) por gema de ovo da galinha-d'angola (*Numida meleagris*) em protocolos de criopreservação de sêmen caprino, com o mesmo nível de proteção das células espermáticas.

## REFERÊNCIAS

- AAMDAL, J.; LYGSET, O.; FOSSUM, K. Toxic effect of lysolecithin on sperm a preliminary report. *Nordisk Veterinariaer Medicin*, v. 17, p. 633- 634, 1965.
- ALCAY, S. et al. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. *Andrologia*, v. 52, n. 4, p. e13555, 2020.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v.7, n.3, p.145-174, 1987.
- BEZERRA, F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. 2010. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.4, Supl., p.S20-S25, 2010.
- BISPO, C. A. S. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005. Disponível em: <http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/TeseBispoSemen>. PDF.
- BORGES, M. S´A; TEXEIRA, A. C. S; DELL’AQUA, C. de P. F; CONTI, L. M.; BORN, J. L. B; MONTEIRO, F. M; JÚNIOR, K. C. P; CRESPILO, A. M. Cinética e integridade de espermatozoides caprinos criopreservados utilizando Red Cushion® como estratégia de proteção espermática durante a centrifugação do sêmen. 2020. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.44, n.1, p.32-38, jan./mar. 2020.
- BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility, *Theriogenology*, v.34, p.147-157, 1990.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Censo Agropecuário 2006: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 777 p.

CÂMARA, T. S; NUNES, T. G. P; TONIOLLI, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. 2018. **Ciência Animal** v.28, n.2 p. 67-83, 2018.

CÂMARA, Talita Soares et al. Fatores envolvidos na criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal**, n. 27, p. 64-79, 2017.

CASTELO, T.S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Doutorado em Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal (Tese). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo-SP, 2005.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, **Manual de exame andrológico**, 2º Ed, Belo Horizonte, Brasil, 2013.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoides de boue conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal effect du glucose. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 14, n. 1B,p. 741-745, 1974.

Costa, R. G.; Almeida, C. C.; Pimenta Filho, E. C.; Holanda Junior, E. V.; Santos, N. M. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO CAPRINO E OVINO NA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DO ESTADO DA PARAÍBA. **BRASIL Archivos de Zootecnia**, vol. 57, núm. 218, junio, 2008, pp. 195-205

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Effects of equilibration periods on the motility of frozen buck semen in raffinose egg yolk glycerol extender. **Indian Journal of Animal Research, Haryana**, v.29, n.2, p.141-144, 1995.

DE MACÊDO, Laércio Fontinele Bandeira et al. Avaliação da viabilidade espermática de sêmen caprino criopreservado em meio ACP-101c e TRIS acrescido de gema de ovo de Numida meleagris. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e265101422064-

e265101422064, 2021.

DE OLIVEIRA PAULA, Ney Rômulo et al. AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE ESPERMATOZOIDE CAPRINO CRIOPRESERVADO, ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO. **Ciência Animal**, v. 30, n. 4, p. 312-316, 2020.

DE SOUZA CASTELO, Thibério; FROTA, Thiago Rodrigues; SILVA, Alexandre Rodrigues. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, London, 1987, 194p, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's, artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, Sydney. Ed.2, p.194, 1987.

FAO. FAOSTAT **Producti on live animals**. Disponível em: Acesso em: 18 nov. 2016.

Fonseca J.F.; Souza J.M.G.; Bruschi J.H. Considerações sobre a eficiência reprodutiva no sistema de produção. In: V Simpósio Mineiro de Ovinocultura, 2009, Lavras. Anais... V **Simpósio Mineiro de Ovinocultura**. Lavras: UFLA, 2009. p. 152-180.

Freitas V.J.F., Baril, G. & Martin G.B. 1997. Physiological limits to further improvement in the efficiency of estrus synchronization in goats. **Reproduction, Fertility and Development** 9: 551-556.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozói de bovino**. 2004. Tese – (Doutorado) Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. ED.7, São Paulo: Manole, 513p. 2004. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA., 6.; SEMINÁRIO

NORDESTINO DE CAPRINO-OVINOCULTURA, 7., 2015, Recife. Saúde animal e produção sustentável no Nordeste: desafios e inovações tecnológicas. Recife: CRMV-PE: SPEMVE, 2015.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Banco de Dados Agregados. Tabela 3939: **Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho**. [Rio de Janeiro, 2012]. Disponível em: . Acesso em: 15 nov. 2023.

IRITANI, A.J.; NISHIKAWA, Y. **Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen**. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. In: SILVER JUBILEE LAB. ANIM. HUSBANDRY KYOTO UNIVERSITY. 1961, Kyoto. Proc.Kyoto:1961. p.97-104.

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

Lima G.F.C. 2009. **Reservas estratégicas de forragem de boa qualidade para bovinos leiteiros**, p.11-35. In: Brito A.S., Nobre F.V. & Fonseca J.R.R. (Eds), Bovinocultura Leiteira: informações técnicas e de gestão. SEBRAE/RN, Natal. 320p.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCE, E.; VINDES-DE-CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; RODRIGUEZ, M. Use of powdered egg yolk vs fresh yolk for the cryopreservation of ovine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 438-441, 2004.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p. 1289–1297, 2009.

Machado, R.; Simplicio, A.A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.19, n.1-2, p.61-72, 1995.

- MAIA, M. da S. Considerações sobre a caprinocultura no Brasil. Rio Branco, AC: EMBRAPACPAF-Acre, 1994. 28 p. (EMBRAPA-CPAF-Acre. Documentos, 17).
- NEVES, M. M. **Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus Domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino.** 2009. 116p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2009.
- MIES FILHO, A., DUTRA, J., GIRÃO, R.N. Congelação do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p.27-57, 1982.
- Moraes Neto, O.T., A. Rodrigues, A.C.A. Albuquerque e S. Mayer. 2003. Manual de capacitação de agentes de desenvolvimento rural (ADRs) para a Caprinovinocultura. **SEBRAE/PB.** João Pessoa. 114 p.
- MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; SCHWEITZER, C.M.; LUZ, S.L.N. Eficácia do etilenoglicol na criopreservação do sêmen ovino congelado em pellets. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 312.
- PEGG, D. E. 2007. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. Molecular Biology.** 2 ed. Totowa: HumanaPress Inc., 348p., 2007.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant: Research**, Estados Unidos, v. 63, n. 11, p. 215-225. 2006.
- Qin, Y.; Yang, S.; Xu, J.; Xia, C.; Li, X.; An, L.; & Tian, J. (2018). Deep insemination with sex-sorted Cashmere goat sperm processed in the presence of antioxidants. *Reproduction in domestic animals*. 53(1), 11-19.
- RIQUE, A. S. **Efeito da centrifugação e açúcares na criopreservação de espermatozoides caprinos.** 2017. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB. 2017.
- RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J.*

**Biol. Sci.**, v.35, n.3, p.305-312, 1982.

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

SAKASHITA, S.M. et al. Inseminação artificial em caprinos: Associação das biotécnicas de diluição e refrigeração do sêmen. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 14, Ed. 201, Art. 1345, 2012.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL**, 3., 2000, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte: SBMA, 2000. p. 194-197.

SANTOS, A.D.F. **Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo**. 2001, 61f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

SANTOS, Maria Alice M. et al. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 925-932, 2015.

SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 1989, Belo Horizonte, MG. Anais. BH: CBRA, 1989, p. 171-177.

SILVA, A R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Criopreservação de sêmen canino: revisão. **Ciência Animal**. V. 11, n. 2, p.119-129, 2001.

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, n. 3, p. 547–555, 1994.

Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction**

**Science**, v.60-61, p.481-492. 2000.

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