

Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino

Carlos Maia Betini^{1*}, Gentil Vanini de Moraes² e Luiz Paulo Rigolon²

¹Hospital Veterinário Prontodog, Av. Anchieta, 556, 87010-310, Zona 2, Tel-Fax: (044)226-3739, Maringá-Paraná, Brazil.

²Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil.

*Author for correspondence.

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito da congelação horizontal e vertical na qualidade do sêmen de caprino da raça Saanen. Esses animais receberam 1,5kg/dia de feno de *coast-cross* (*Cynodon dactylon*), 0,5kg/dia de ração formulada com milho triturado (70%) e farelo de soja (30%), além de livre acesso a suplemento mineral e água. A colheita do sêmen foi realizada com vagina artificial, uma vez por semana, durante 5 semanas. Ao efetuar a análise de variância, observou-se que a motilidade progressiva e o índice de sobrevivência foram melhores ($P<0,05$) na congelação vertical (31,3% e 29,01%) do que na horizontal (28,00% e 26,86%), respectivamente. Não houve influência ($P<0,05$) dos métodos de congelação de sêmen sobre o vigor dos espermatozoides, que foi de 2,46 pontos na congelação vertical e de 2,26 pontos na horizontal. Concluiu-se que a congelação de sêmen pelo método vertical proporcionou sêmen de melhor qualidade para a inseminação artificial.

Palavras-chave: bode, congelação horizontal e vertical, sêmen.

ABSTRACT. Vertical and horizontal freezing effect in caprine semen quality. This work was carried out to study the vertical and horizontal freezing effect on the quality of Saanen caprine breed semen. The animals were fed on 1.5kg/day coast-cross (*cynodon dactylon*), 0.5kg/day feed-stuff containing ground corn (70%) and soybean bran (30%), and free access to mineral supplement and water. The semen was collected through manikin once a week for 5 weeks. Variance analysis showed that the progressive motility and the survival rate were higher ($P<0.05$) in the vertical freezing (31.3% and 29.01%) than in the horizontal freezing (28.0% and 26.86%) respectively. There was no influence of semen freezing methods ($P<0.05$) on the spermatozoa vigor which was of 2.46 points in the vertical and 2.26 in the horizontal freezing method. It was concluded that the vertical freezing method produced the best caprine semen quality to be used in artificial insemination.

Key words: caprine, horizontal and vertical freezing, semen.

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica de reprodução animal que visa ao uso intensivo de reprodutores portadores de genes desejáveis. Essa forma de fecundação propaga os genes com maior rapidez e facilita a avaliação genética de um indivíduo de forma eficiente, quando comparada à monta natural (Herman *et al.*, 1994). Sob esse ponto de vista, é interessante desenvolver técnicas que preservem o sêmen por longo tempo (Lima *et al.* 1994). Uma outra vantagem da IA consiste na congelação do sêmen, tornando-se uma das alternativas de aproveitamento de reprodutores nos casos de quiescência sexual do macho (Westhuysen, 1978).

De acordo com Traldi (1994), o sêmen de

caprino pode ser utilizado nas inseminações artificiais, fresco, resfriado ou congelado. Este mesmo autor afirmou que o sêmen congelado pode ser preservado por longo período, mantido em nitrogênio líquido (-196°C), tornando-se de maior aplicabilidade quando comparado ao sêmen resfriado, cuja viabilidade máxima é de 24 horas.

Para que se obtenham bons resultados na congelação de sêmen de caprinos, não basta somente levar em consideração métodos de congelação, mas também os elementos tóxicos que existem nos ejaculados de caprinos, tornando-se necessário a lavagem dos mesmos (Corteel, 1974; Souza e Mies Filho, 1986; Toniolli, 1989).

O sucesso na congelação de sêmen de caprinos, com aceitável índice de concepção após a descongelação, foram reportados por Fraser (1962) e Barker (1963). O processo de congelação do sêmen consiste em baixar gradativamente a temperatura, de 5°C para -196°C, realizado através da colocação de ampolas ou palhetas em posição horizontal sobre um suporte, o qual é suspenso sobre o nitrogênio líquido por 5 a 30 minutos (Herman *et al.*, 1994). Neste sentido, Souza e Mies Filho (1986) trabalharam com sêmen de caprinos. Para a atividade, as palhetas foram colocadas em posição vertical a fim de serem congeladas, tendo obtido 40,74% de motilidade progressiva na descongelação do sêmen. Rodriguez *et al.* (1975), trabalhando com sêmen de touros da raça Aberdeen-Angus, Hereford e Charolês, compararam os resultados de sêmen congelado na posição horizontal e vertical e observaram que, na descongelação, a motilidade espermática obtida foi maior para o sêmen congelado na posição horizontal quando comparado ao vertical. Konmisrud *et al.* (1996), trabalhando com sêmen de bovino congelado horizontalmente na superfície do nitrogênio líquido, observaram, na descongelação, a média de 56,05% de motilidade progressiva. Além disso, obtiveram 72,5% de não retorno ao cio de fêmeas, ao terem sido inseminadas com este sêmen.

As diferentes metodologias de processamento seminal exercem grande influência nas características do sêmen descongelado, fator que motivou o estudo dos efeitos da posição de congelação do sêmen sobre as características após a descongelação.

Material e métodos

Local. O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no período de abril a maio de 1996.

Animais. Foram utilizados três machos da raça Saanen, com dezoito meses de idade, simetria testicular e bolsa escrotal sem qualquer alteração, prepúcio e pênis normais, boa libido e livres de doenças.

Alimentação. Os animais receberam 0,5kg de ração formulada por milho moído (70%), farelo de soja (30%) e 1,5kg/dia de feno (*Cynodon dactylon*), além de livre acesso ao mineral e à água, tendo sido liberados das 9h às 16h, para permanecerem em piquetes com pastagem de *coast-cross* (*Cynodon dactylon*), e em seguida, recolhidos para o estábulo.

Métodos de Colheita do Sêmen. O sêmen foi colhido por meio de vagina artificial, modelo

brasileiro, constituída por um cilindro rijo, aberto em ambas as extremidades, mucosa de borracha, válvula controladora de entrada e saída de água, copo coletor graduado e uma proteção de tecido escuro (Mies Filho, 1987).

A preparação da vagina artificial consistiu na passagem da mucosa de borracha pelo tubo rijo, que foi revertida sobre as extremidades e fixada. Em uma das extremidades colocou-se o copo coletor e a outra, a de penetração, foi lubrificada com vaselina neutra, sólida. A vagina foi preenchida com água a 60°C, até a obtenção da pressão necessária para a colheita do sêmen, obtendo-se a temperatura média de 43°C (42 a 44°C) no ato da colheita. Além disso, o copo coletor foi revestido com o saco de tecido escuro, para proteger sêmen das variações térmicas e radiação solar ultravioleta. A colheita foi realizada utilizando-se cabras em cio natural, que foram colocadas em um tronco de contenção. A periodicidade da colheita foi semanal, tendo sido realizada por 5 semanas consecutivas.

No início do experimento, fez-se a tricotomia dos pêlos do prepúcio e pouco antes de cada colheita, foi feita a higienização, utilizando-se solução de Kilol-L 2% (Laboratório Chemie Brasileira). O desinfetante foi introduzido no interior do prepúcio por três vezes consecutivas, com uma seringa.

Exames do sêmen. O sêmen colhido foi colocado em banho-maria a 37°C, para preservação dos espermatozoides durante as análises. Os materiais utilizados no experimento, como lâminas, lamínulas, corantes, pipetas e recipientes, foram colocados sobre uma placa aquecedora a 37°C, evitando que os espermatozoides passassem por variações térmicas.

1. Volume. A determinação do volume do ejaculado foi realizada no laboratório, através de leitura no copo coletor graduado, antes da colocação no banho-maria.

2. Cor. A cor do sêmen foi determinada visualmente, de acordo com Mies Filho (1987).

3. pH. O pH foi determinado colocando-se uma gota de sêmen sobre uma fita de papel tornassol (Mies Filho, 1987).

4. Turbilhonamento. Para proceder-se a avaliação do turbilhonamento, colocou-se uma gota de sêmen recém-colhido sobre uma lâmina a 37°C, levando-a ao microscópio de contraste de fase, com 10x. A interpretação foi subjetiva, sendo considerada uma escala de zero a cinco pontos (Fonseca *et al.*, 1992).

5. Motilidade progressiva (MP). Foi determinada colocando-se 1 gota de sêmen sobre uma lâmina e adicionando-se 25 gotas de citrato de sódio a 3%. O material foi homogeneizado e retirada uma gota que

foi colocada sobre uma lâmina a 37°C e coberta com lamínula. Este material foi levado ao microscópio de contraste de fase e observado em 40x, avaliando-se a MP individual dos espermatozóides. A avaliação foi subjetiva, considerando-se variações de 0 a 100%. Para a avaliação do sêmen congelado, não utilizou-se a diluição.

6. Vigor (V). Esta avaliação foi realizada a partir da lâmina preparada para MP e classificado numa escala de zero a cinco pontos, em que os valores mais elevados indicaram sêmen de melhor qualidade.

7. Índice de Sobrevivência (IS). Foi determinado em microscópio óptico de contraste de fase em 40x, a partir de esfregaço feito com mistura de uma gota de eosina vermelha a 3% (corante), uma gota de nigrosina a 5% (contra-corante) e uma gota de sêmen. A mistura foi homogeneizada por 30 segundos e uma gota da mesma foi colocada sobre uma lâmina, preparando-se um esfregaço, que após a secagem foi levado ao microscópio em 40x. Contaram-se os espermatozóides não corados (brancos) e corados (rosa). Para se determinar o valor do IS, foram contados 100 espermatozóides entre corados e brancos, dividindo-se as células brancas pelo total e multiplicando-se por 100.

8. Concentração Espermática. Para determinação da concentração espermática, foi utilizada a câmara de Neubauer dupla, em que o sêmen foi diluído em cloreto de sódio a 3%, na proporção de 1:400, utilizando-se a pipeta de Sahli. Preenchida a câmara de Neubauer, o material foi levado ao microscópio de contraste de fase em 40x (Fonseca *et al.*, 1992).

9. Morfologia Espermática (ME). Na avaliação das características morfológicas do sêmen antes da congelação, utilizou-se o mesmo material preparado para a análise da MP. Para tanto, imediatamente após cada colheita foram preparados dois esfregaços delgados em lâminas a 37°C. Estas lâminas, após a coloração, foram avaliadas em microscópio de contraste de fase, contando-se, no mínimo, 400 células.

Na avaliação do sêmen congelado, o procedimento foi semelhante, colocando-se uma gota de sêmen da palheta recém-descongelada diretamente na lâmina, preparando-se o esfregaço. O sêmen foi corado pelo método de Willians (1920), modificado por Lagerlöf (Lagerlöf, 1934).

Processamento de sêmen

a) Lavagem do sêmen. O processo de lavagem consistiu na diluição do ejaculado na proporção de 1:9, em solução de citrato de sódio 3% a 37°C e centrifugação a 500 g por 15 minutos, à temperatura

ambiente. Desprezou-se o sobrenadante, desfez-se o precipitado e a lavagem foi repetida.

b) Diluições. A diluição iniciou-se com a pré-diluição, com solução à base de leite em pó desnatado a 10%, sem glicerol, utilizando-se metade do volume total de diluidor, a 37°C. Em seguida, avaliou-se a MP e as amostras foram levadas para geladeira, à temperatura de 15 a 18°C, durante 60 a 90 minutos.

Em uma segunda etapa, fez-se a diluição final com leite em pó desnatado a 10%, contendo 14% de glicerol e antibióticos, a 5°C. Neste procedimento foi adicionado 1/3 do diluidor final a cada 10 minutos, resultando, na diluição final de 7% de glicerol. Concluído o processo, procedeu-se a avaliação da MP a 40x.

c) Envase. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5ml, contendo 200.000.000 espermatozóides normais, a 5°C, lacrando-se sua extremidade livre com álcool polivinílico. As palhetas foram identificadas de acordo com cada reprodutor, data e o método de congelação (vertical ou horizontal).

Congelação

1. Horizontal. Este procedimento foi realizado em uma câmara de congelação, feita com uma caixa de isopor de 35x40x40cm, dotada de suporte de sustentação para conter as palhetas em posição horizontal. Para efetuar-se a congelação, colocou-se 15cm (em altura) de nitrogênio líquido e o suporte contendo as palhetas foi fixado a 5cm da superfície do nitrogênio, a -70 a -80°C, permanecendo nesta posição por 15 minutos. Ao final desse tempo, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido por 5 minutos, a -196°C.

2. Vertical. A congelação vertical foi realizada em aparelho de congelação vertical, desenvolvido por Souza e Mies Filho (1986). Tal aparelho consistiu de uma caixa de madeira (30x38x21cm) preenchida com isopor, uma abertura cilíndrica central de 9,5cm no isopor e um suporte para a sustentação das palhetas na posição vertical. Esse suporte foi formado por um cilindro de tela metálica de 8,5cm de diâmetro e 11,5cm de altura, uma parte superior e outra inferior, constituídas por placas perfuradas de aço inoxidável que permitiram a passagem das palhetas. Sob a placa inferior, foi colocada uma tela fina de apoio para as palhetas e, para facilitar o manuseio, uma estrutura de arame em forma de alça na parte superior.

O sêmen foi colocado no cilindro e, este por sua vez, na caixa de congelação, à altura de 5cm da superfície do nitrogênio líquido, por 15 minutos, a -

70 a -80°C . Decorrido esse tempo, o sêmen foi imergido no nitrogênio líquido, durante 5 minutos.

Em ambos os métodos de congelamento, decorrido o tempo de imersão, uma palheta foi descongelada a 37°C , por 60 segundos, para avaliar a MP. As partidas que apresentaram motilidade progressiva menor que 25% foram desprezadas. Na sequência, as palhetas foram transferidas para o botijão de estocagem.

Descongelamento. A descongelamento foi realizada 30 dias após cada processo de congelamento, por imersão da palheta em banho-maria, a 37°C , por 60 segundos. Foram avaliados: MP, V, ME, IS e IA.

Análise Estatística. MP, V, IS, ME e IA foram avaliados pela análise de variância, usando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + R_j + C_k + E_{ijk}$$

onde:

Y_{ijk} = é a observação k do reprodutor j submetido ao tratamento i

μ = é a constante geral

T_i = é o efeito do tratamento i , $i=1;2$

R_j = é o efeito do reprodutor j , $j=1;\dots;3$

C_k = é o efeito da colheita k , $k=1;\dots;5$

E_{ijk} = é o erro aleatório associado a cada observação Y_{ijk} .

Para a comparação entre as médias, utilizou-se o teste de Tukey a 5% e grau de liberdade do resíduo igual a 22.

Resultados e discussão

As análises da MP, do V, do IS e das anormalidades espermáticas, feitas antes e após a congelamento do sêmen, tanto na posição vertical como na horizontal, estão apresentadas na Tabela 1 e 2.

Tabela 1. Médias e erros padrão da motilidade progressiva, vigor, índice de sobrevivência e índice de anormalidades das análises de sêmen realizadas antes da congelamento

Motilidade progressiva	Vigor	Índice de Sobrevivência	Índice de Anormalidade
$86,00 \pm 1,08$	$3,66 \pm 0,11$	$87,00 \pm 0,69$	$19,70 \pm 2,5$

Tabela 2. Coeficientes de variação, médias e erros padrão da motilidade progressiva, vigor, índice de sobrevivência e índice de anormalidades do sêmen congelado na posição horizontal e vertical

Variáveis	Horizontal	Vertical	Coefficiente de Variação
Motilidade progressiva (%)	$28,0 \pm 1,12^a$	$31,33 \pm 1,12^b$	14,72
Vigor (0-5 pontos)	$2,26 \pm 0,11^a$	$2,46 \pm 0,11^a$	18,75
Índice de sobrevivência (%)	$26,86 \pm 0,67^a$	$29,06 \pm 0,67^b$	9,29
Índice de anormalidades (%)	$25,0 \pm 3,19^a$	$27,0 \pm 3,19^a$	16,70

* Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem estatisticamente ($P < 0,05$)

A MP e o IS dos espermatozoides alcançaram melhores resultados ($P < 0,05$) no sêmen congelado pelo método vertical em comparação ao método horizontal (Tabela 2). Com relação à MP, Rodriguez *et al.* (1975), ao trabalharem com a congelamento de sêmen de bovinos, obtiveram resultados contrários aos deste estudo, tendo verificado melhor motilidade progressiva após a descongelamento, no método horizontal em comparação ao vertical. Esta diferença pode ser explicada pelas características bioquímicas do sêmen de caprino, que possui fosfolipases responsáveis pela hidrólise dos lipídeos existentes no sêmen e no diluidor, em ácidos graxos e lisofosfolipídeos tóxicos aos espermatozoides (Chauhan e Anand, 1990). Nesse sentido, Corteel (1974), Westhuysen (1978), Souza e Mies filho (1986) e Chandler *et al.* (1988) recomendaram a lavagem do sêmen para remoção do plasma seminal e redução dos efeitos tóxicos de tais substâncias, critério adotado nesta pesquisa. Possivelmente, o melhor resultado de MP observado no método de congelamento vertical, deva-se à sedimentação dos espermatozoides na extremidade inferior das palhetas. Este processo promove a separação esperma-meio, reduzindo, desta forma, os efeitos tóxicos de restos de fosfolipases sobre as células espermáticas, além de uma menor alteração osmótica, causando menores lesões sobre a membrana espermática (Correa *et al.*, 1996). Souza e Mies Filho (1986) trabalharam com o efeito da lavagem sobre o sêmen de caprino e observaram a média de 40,74% de MP na congelamento vertical, valor um pouco superior aos 31,33% observados neste estudo. Trabalhando com congelamento horizontal, Lima *et al.* (1994) obtiveram a média de 21,2% de MP na raça Saanen, para sêmen descongelado 30 dias após a congelamento, valor este, inferior aos 28,0% obtidos neste estudo. Já Konmisrud *et al.* (1996), ao pesquisarem os efeitos da congelamento horizontal sobre a MP, notaram, na descongelamento, 56,05% de MP, o que pode revelar a sensibilidade do sêmen de caprino à congelamento (Deka e Rao, 1989). Contudo, Fraser (1962) e Barker (1963) salientaram ser possível obter-se índices aceitáveis de concepção com sêmen de caprino congelado. De acordo com Lima *et al.* (1994), um sêmen de boa qualidade deve apresentar 85% de motilidade progressiva e não menos que 70% para ser congelado. No presente estudo, a MP, antes da congelamento, foi de 86%, enquadrando-se nas considerações citadas.

O melhor IS observado no método de congelamento vertical, talvez possa ser explicado pelos mesmos motivos relatados em relação à MP, levando-se em consideração a sedimentação das células espermáticas na parte inferior da palheta, mantendo-as livres de resíduos de fosfolipases, durante a congelamento.

Os métodos de congelamento não influenciaram ($P < 0,05$) sobre o vigor dos espermatozoides (Tabela 2). O vigor dos espermatozoides pode variar de 0 a 5 pontos (Derivaux, 1980), devendo, na congelamento, ser no mínimo igual a 3. Contudo, neste estudo, observaram-se, na descongelamento, valores menores que os referidos pelo autor (Tabela 2), provavelmente devido ao processo provocar danos às células espermáticas (Deka e Rao, 1989), uma vez que o material anterior à congelamento apresentava vigor superior a 3 pontos (Tabela 1).

Os métodos de congelamento não influenciaram ($P < 0,05$) sobre o índice de normalidade espermática (Tabela 2). Ao estudarem sêmen de caprino, Ali e Mustafa (1986) encontraram a média de 22,0% de patologias primárias e secundárias, enquanto neste estudo, os valores foram um pouco superiores, sendo de 25,0% na congelamento horizontal e 27,0% na congelamento vertical. Mesmo assim, estes valores encontram-se dentro de limites em que o sêmen pode apresentar boa fecundidade, uma vez que Sorensen, Jr. (1979), destacou problemas com sêmen que apresente patologias com valores superiores a 25%.

Ao analisar, separadamente, as patologias espermáticas, foi possível observar que o índice de inserção abaxial foi maior ($P < 0,05$) na congelamento horizontal (1,4%) que na vertical (0,6%). Contudo, esta patologia é de ordem primária e surge devido a falhas na espermatogênese (Casagrande *et al.*, 1979), o que, portanto, não se pode atribuir a efeitos derivados da congelamento, mas mera coincidência. As demais patologias citadas por Casagrande *et al.* (1979) não apresentaram efeito devido à posição de congelamento ($P < 0,05$).

Considerando os resultados obtidos nas condições em que foi realizada esta pesquisa, pode-se concluir que a congelamento vertical proporcionou melhores resultados em relação à motilidade progressiva e índice de sobrevivência, conseguindo-se, assim, sêmen com maior viabilidade para a inseminação artificial.

Referências bibliográficas

Ali B.H.; Mustafa, A.I. Semen characteristics of nubian goats in the Sudan. *Anim. Reprod. Sci.*, 12:63-68, 1986.

Barker, C.A.V. Frozen semen for AI in dairy goats and swine. *Proc. Anim. Conv. Assoc. Anim. Breeds*. p. 132, 1963

Casagrande, J.F.; Pinheiro, L.E.L.; Almeida, C.A.; Ferraz, J.B.S.A. Patologia espermática agrupada segundo Blom (1972) na avaliação de sêmen para a congelamento. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 2(5):19-23, 1979.

Chandler, J.E.; Painter, C.L.; Adkison, R.W.; Memon, M.A.; Hoyot, P.G. Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.*, 71:1638-1646, 1988.

Chauhan, M.S.; Anand, S.R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, 34(5):1003-1013, 1990.

Correa, J.R.; Rodriguez, M.C.; Patterson D.J.; Zavos P.M. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 46:413-420, 1996.

Cortcel, J.M. Viabilité des espermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Annls. Biol. Bioch. Biophys.*, 14(4b):741-745, 1974.

Deka, B.C.; Rao, A.R. Effect of washing on the fertility of frozen goat semen. *Ind. Vet. J.*, 66:268-269, 1989.

Derivaux, J. *Reprodução dos animais domésticos*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 446p.

Fonseca, V.O.; Vale Filho, V.R.; Mies Filho, A.; Abreu, J.J. *Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79p.

Fraser, A.F. A technique for freezing goat semen and results of a small breeding trial. *Can. Vet. J.*, 3:133, 1962.

Herman, H.A.; Mitchell, J.R.; Doak, G. A. *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. 8.ed. Danville: Interstate Publishers, 1994. 382p.

Konmistrud, E. Graffer, T.; Steine, T. Comparison of two processing systems for bull semen with regard to post-thaw motility and non return rates. *Theriogenology*, 45(8):1515-1521, 1996.

Lagerlöf, N. Morphologische Untersuchungen Über Veranderugen in Spermanbid und in Den Hoden Bei Bullen Mit Verminderter Oder Aufgehobener Fertilitat. *Acta. Pathol. e Microbiol. Scand. Suppl. XIX*. Tesis. 1934.

Lima, S.; Moraes, G.V.; Moreira, H.L.M.; Macedo, F.A.F.; Macedo, L.G.P. Avaliação de épocas do ano sobre as características do sêmen de caprinos antes e após a congelamento. *Rev. Unimar*, 16(1):181-194, 1994.

Mies Filho, A. *Reprodução dos animais*. Porto Alegre: Livraria Sulina, 1987. v.1.

Mies Filho, A. *Inseminação artificial*. Porto Alegre: Livraria Sulina, 1987. v.2.

Rodriguez, O.L.; Berndtson, W.E.; Ennen, B.D.; Picckett, B.W. Effect of rates of freezing, thawing and level of glicerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.* 41(1):129-136. 1975.

Souza, I.M.; Mies Filho, A. Congelamento do sêmen de bode. Efeito de duas soluções de lavagem. *A Hora Veterinária*, 29:53-57, 1986.

Tonioli, R. Estudos das características *in vitro* do sêmen caprino de raças nativas do nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma *in natura*, estabilizada e de gel. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 4(13):209-220, 1989.

Traldi, A.S. Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos. São Paulo: [s.n.], 1994. 53p. (apostila).

Sorensen JR., A.M. *A laboratory manual for animal reproduction*. 4 ed. Boston: American Press, 1979. 154p.

Westhuysen, J.M. van der. Observations on the deep-freezing of Angora goat semen. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 8:11-113, 1978.

Received on October 14, 1997.

Accepted on February 12, 1998.

