



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**VIABILIDADE DO SÊMEN CAPRINO CONSERVADO EM TRÊS DIFERENTES
DILUIDORES: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal**

Bruno Galvão de Matos Brito

FORTALEZA - CEARÁ

Fevereiro de 2008

BRUNO GALVÃO DE MATOS BRITO

**VIABILIDADE DO SÊMEN CAPRINO CONSERVADO EM TRÊS DIFERENTES
DILUIDORES: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Zootecnia – Área de Concentração: Manejo Reprodutivo.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Nascimento Campos.

FORTALEZA - CEARÁ
Fevereiro de 2008

BRUNO GALVÃO DE MATOS BRITO**VIABILIDADE DO SÊMEN CAPRINO CONSERVADO EM TRÊS DIFERENTES
DILUIDORES: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Zootecnia – Área de Concentração: Manejo Reprodutivo.

Dissertação aprovada em 29/02/2008

BANCA EXAMINADORA

Professora Dr^a. Ana Cláudia Nascimento Campos
ORIENTADORA

Professor Dr. Arlindo Alencar Noronha Araripe Moura
CO-ORIENTADOR (UFC)

Dr^a. Emmanuelle Lima de Figueirêdo
EXAMINADORA (Bolsista DCR/ FUNCAP/ CNPq)

Professor Dr. José Ferreira Nunes
EXAMINADOR (UECE)

C361a Matos Brito, Bruno Galvão

Viabilidade do Sêmen Caprino conservado em três diferentes diluidores: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal [manuscrito] / Bruno Galvão de Matos Brito

61 f., il., enc.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Orientadora: Ana Cláudia Nascimento Campos
Área de concentração: Manejo Reprodutivo

1. Caprino – Plasma seminal - Avaliação I. Campos, Ana Cláudia Nascimento
II. Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Zootecnia III. Título

**A minha esposa, Liana, por me fazer mais feliz a
cada dia.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisco e Maria Christina, por terem acreditado no meu potencial e investido no meu futuro.

Aos meus irmãos, Luciana, Juliana, Renata e Fábio (*in memoriam*), por mostrarem que a família é mais importante que qualquer coisa no mundo, e aos meus cunhados, Paulo, Antônio e Rafael, pelo carinho com que tratam minha família.

Aos amigos Artur, Ingrid, Alexandra, Bernardo, Mariana, Maurício, Lima e Suyanne, pelos momentos de descontração que fazem o dia-a-dia mais agradável.

À Professora Dr.^a. Ana Cláudia Nascimento Campos, pelo apoio, paciência, riqueza de ensinamentos, compreensão e por tornar o curso uma realidade para mim.

À Gyselle Aguiar e Ana Gláudia Catunda, pela ajuda na execução dos experimentos, paciência nos ensinamentos e pelos momentos de descontração na faculdade.

Aos professores do curso de pós-graduação da Universidade Federal do Ceará que enriqueceram e amadureceram meus conhecimentos.

Aos colegas do curso de pós-graduação, que atravessaram comigo essa fase de aprimoramento.

À Universidade Federal do Ceará – UFC e Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, por proporcionar minha capacitação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos alunos dos cursos de graduação em Agronomia e Zootecnia da UFC, Jeane Ferreira, Rafael Soares, Ítalo Cordeiro, Michelle Moura, Airton Rodrigues, Marco Antonio Basílio Linard, Sarah Gomes, Fabiano Malveira e Assis Rubens Montenegro, pela disponibilidade e apoio na execução do experimento.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para superação de mais esse grau acadêmico.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Um dos principais objetivos de um programa de inseminação artificial em caprinos é produzir o maior número de descendentes de animais geneticamente superiores com a finalidade de melhorar a produção animal. Para tanto é necessário que se dominem técnicas de diluição e de armazenamento de sêmen nesta espécie. Neste trabalho foram testados três diferentes diluidores, citrato-gema (CG), TRIS-gema (TG) e água de coco industrializada (ACI) e dois grupos de animais, com alto nível inicial de frutose (grupo I) e com baixo nível inicial de frutose (grupo II) no plasma seminal. O sêmen foi armazenado por até 48h a 5°C e avaliado nos tempos 0 (fresco), 2, 24 e 48h, onde uma amostra do sêmen conservado foi submetida ao teste de termo-resistência (TTR) a 38°C por 2h. Durante a incubação foram verificados os parâmetros de motilidade (MOT) e vigor (VIG), nos tempos 5, 60 e 120 minutos e ao final foi calculada a taxa de degradação da motilidade (TDM). Esfregaços de sêmen foram realizados para verificação das possíveis alterações morfológicas. Houve uma queda significativa nos parâmetros analisados no decorrer do tempo de armazenamento, independente do diluidor utilizado ($P < 0,05$). Contudo, o diluidor ACI apresentou resultados inferiores aos dos demais. O efeito do grupo foi observado apenas no ACI, mostrando que este diluidor não conseguiu suprir as necessidades energéticas dos espermatozoides cuja concentração inicial de frutose no plasma estava baixa. Os diluidores CG e TG comportaram-se de forma semelhante nos dois grupos. Foi encontrada diferença significativa na atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂) entre os grupos ($P < 0,05$), sendo que uma atividade superior foi observada no grupo II. Concluiu-se que, independente do diluidor utilizado, os parâmetros seminais tendem a cair conforme o tempo de conservação é prolongado. Além disso, a concentração inicial de frutose não interferiu na qualidade espermática quando os diluidores CG e TG foram utilizados, todavia, quando os níveis deste componente no plasma seminal foram superiores a 740 mg/dL ocorreu um aumento na sobrevivência dos espermatozoides conservados a 5 °C, quando se utilizou ACI. Sugere-se que o baixo desempenho espermático também possa ser devido a uma maior atividade de PLA₂, contudo mais estudos, contendo um maior número de animais, são necessários para elucidar esta hipótese.

ABSTRACT

One of the main objectives of the artificial insemination program in goats is to produce the highest number of descendants of genetically superior animals with the purpose to improve the animal production. Thus, it is necessary to dominate correct techniques of dilution and semen storage in this specie. In this work three different extenders had been tested: citrate-egg yolk (CE), TRIS-egg yolk (TE) and industrialized coconut water (ICW) and two groups of animals: with high initial level of fructose (group I) and with low initial level of fructose (group II) in the seminal plasma. The semen was stored until 48h at 5°C and evaluated in times 0 (fresh), 2, 24 and 48h, where a sample of the conserved semen was submitted to the term-resistance test (TTR) that consists of incubate the sample at 38°C for 2h. During the incubation it had been verified the parameters of Motility (MOT) and vigor (VIG), in times 5, 60 and 120 minutes and to the end was calculated the tax of degradation of the motility (TDM) and semen slides had been carried through for verification of the possible morphologic alterations. It had a significant fall in the parameters analyzed in elapsing of the time of storage, independent of the used extender ($P < 0,05$). However, extender ICW presented inferior resulted than the others. The effect of the group was observed only in the ICW, showing that this extender did not supply the energy necessities of the spermatozoa whose initial concentration of fructose in the plasma was low. CE and TE worked similarly in the two groups. Significant difference in the activity of phospholipase A₂ between the groups was found ($P < 05$), in way that a bigger activity was observed in group II. In conclusion, independent of the used extender, the seminal parameters tend to fall as draw out the conservation time. Moreover, the initial concentration of fructose did not intervene with the sperm quality when extenders CE and TE had been used, however, when the levels of this component in the seminal plasma had been superior to 740mg/dL, occurred an increase in lifetime of the spermatozoa conserved at 5°C, when ICW was used. It suggests that sperm low action also can be due to a higher activity of PLA₂, however more studies are necessary, with a large number of animals to elucidate this hypothesis.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADRO 1** - Composição do diluidor TG..... pág. 17
- QUADRO 2** - Composição do diluidor CG..... pág. 18
- QUADRO 3** - Composição do diluidor AC..... pág. 19
- TABELA 1** - Médias \pm desvio-padrão dos parâmetros vigor, motilidade e TDM do sêmen caprino diluído em três diferentes diluidores.....pág. 30
- TABELA 2** - Médias \pm desvio-padrão dos parâmetros vigor, motilidade e TDM do sêmen caprino diluído em três diferentes diluidores após a divisão em grupos de animais com alto ou baixo nível de frutose seminal..... pág. 30

SUMÁRIO

RESUMO	pág. VI
ABSTRACT	pág. VII
LISTA DE QUADROS E TABELAS	pág. VIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	pág. X
1 INTRODUÇÃO	pág. 01
2 REVISÃO DE LITERATURA	pág. 03
2.1 Principais constituintes do plasma seminal e sua ação sobre os espermatozóides durante a ejaculação.....	pág. 03
2.1.1 Principais eletrólitos do plasma seminal e sua importância sobre O metabolismo espermático	pág. 05
2.1.2 Proteínas e enzimas do plasma seminal e sua ação sobre os Espermatozóides.....	pág. 07
2.1.3 Frutose e ácido cítrico no plasma seminal.....	pág. 08
2.1.4 Fosfolipase A ₂	pág. 10
2.1.4.1 Caracterização das fosfolipases.....	pág. 10
2.1.4.2 Ação da fosfolipase no sêmen caprino.....	pág. 11
2.2 Conservação do sêmen no estado líquido.....	pág. 12
2.3 Problemática da conservação do sêmen caprino.....	pág. 14
2.4 Diluidores.....	pág. 16
2.4.1 Diluidor TRIS-gema (TG).....	pág. 17
2.4.2 Diluidor citrato-gema (CG).....	pág. 18
2.4.3 Diluidor água de coco (AC).....	pág. 19
2.4.4 Crioprotetores.....	pág. 20
2.4.4.1 Gema de ovo.....	pág. 21
3 JUSTIFICATIVA	pág. 21
4 HIPÓTESE	pág. 23
5 OBJETIVOS	pág. 24
5.1 Objetivo geral.....	pág. 24
5.2 Objetivos específicos.....	pág. 24
6 MATERIAL E MÉTODOS	pág. 25
6.1 Local do experimento.....	pág. 25
6.2 Animais experimentais.....	pág. 25
6.3 Diluidores utilizados.....	pág. 25
6.4 Colheita e tratamento do sêmen.....	pág. 25
6.5 Morfologia espermática.....	pág. 27
6.6 Análise estatística.....	pág. 27
7 RESULTADOS	pág. 28
7.1 Efeito do tempo de conservação.....	pág. 28
7.2 Efeito do diluidor.....	pág. 28
7.3 Efeito de grupo.....	pág. 28
8 DISCUSSÃO	pág. 31
8.1 Efeito do tempo de conservação.....	pág. 31
8.2 Efeito do diluidor.....	pág. 32
8.3 Efeito de grupo.....	pág. 32
9 CONCLUSÃO	pág. 36
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pág. 37

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
AAT	Aspartato amino desidrogenase
ACI	Água de coco industrializada
AMT	Alterações Morfológicas Totais
PS	Plasma Seminal
BUSgp60	60-KDa glycoprotein from bulbourethral gland secretion
Ca ⁺⁺	Íon Cálcio
CG	Citrato-gema
Cl ⁻	Íon cloreto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GoPLRP ₂	Pancreatic-lipase-related protein 2 of goat
GPT	Piruvato-glutâmico transferase
K ⁺	Íon Potássio
LDH	Lactato desidrogenase
Mg ⁺⁺	Íon Magnésio
Min	Minutos
mg/dL	miligramas por decilitro
mM	Milimolar
Na ⁺	Íon sódio
NCD	Descondensação da cromatina nuclear
O ₂	Oxigênio
pH	potencial de hidrogenação
pKa	Acidez logarítmica
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLPR ₂	Pancreatic-lipase-related protein 2
PO ₄ ⁻	Íon fosfato
q.s.p.	Quantidade suficiente para
TG	TRIS-gema
TRIS	Trishidroximetilaminometano
TTR	Teste de termorresistência
TDM	Taxa de degradação da motilidade
UHT	Ultra High Temperature
Zn ⁺⁺	Íon Zinco

1. INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de melhorar a capacidade fertilizante do sêmen caprino congelado e resfriado que ainda apresentam resultados insatisfatórios quando utilizados *in vivo*. Após a diluição e refrigeração ocorrem danos provocados nas células espermáticas que reduzem a motilidade e rompem a integridade das membranas dos espermatozóides. Estas alterações interferem significativamente na sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozóides (MARTIN, 1968; MAXWELL & WATSON, 1996).

Há muito tempo que o plasma seminal (PS) tem sido objeto de intensas investigações bioquímicas, seja pela capacidade de influenciar a fertilidade potencial do espermatozóide ou pelo fato de que alguns de seus constituintes seminais tenham suas origens em órgãos específicos, cujas concentrações são importantes para avaliar a capacidade secretora de várias glândulas sexuais anexas, as quais dependem da produção de andrógenos pelos testículos para desempenhar suas funções (MANN, 1974).

Apesar dos consideráveis avanços, os conhecimentos sobre a função do PS na espécie caprina ainda são escassos. O tratamento do sêmen *in vitro* ocasiona variações no metabolismo e/ou sobrevivência dos espermatozóides e, além disso, a inexistência de mecanismos de eliminação das células espermáticas mortas submete os gametas vivos a uma convivência com os produtos de sua decomposição (CORTEEL, 1980). Neste sentido, SKANDHAN (1981) reconheceu que as alterações de muitos dos componentes do PS são responsáveis pela incapacidade de fecundação do gameta.

O PS dos mamíferos é um complexo fluido, produzido pelas múltiplas glândulas do aparelho reprodutivo do macho que serve como carreador para os espermatozóides em sua jornada dos testículos ao seu alvo, o ovócito. Além disso, o PS é conhecido por inibir ou estimular a função espermática e a fertilidade (MARTI *et al.*, 2007). FRAZER & BUCCI (1996) afirmaram que o PS é composto de açúcares, lipídios e minerais, bem como de um elevado teor de proteínas especiais, incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, inibidores, imunossuppressores, substâncias ligadas a andrógenos, inibina e imunoglobulinas, onde a presença ou ausência de muitos destes componentes pode estar envolvida com a fertilidade.

O PS serve como veículo no transporte dos espermatozóides até o trato genital da fêmea, promove a ativação metabólica das células espermáticas, disponibilizando nutrientes

para o seu metabolismo e retarda o processo de capacitação para que este ocorra no trato genital feminino (EVANS & MAXWELL, 1990; MÜLLER *et al.*, 1997). O reconhecimento de proteínas características do plasma seminal sugere que estas modulam importantes funções espermáticas após a ejaculação e no trato reprodutivo da fêmea (MOURA *et al.*, 2007, CARDOZO *et al.*, 2006). LA FALCI *et al.* (2002) identificaram, pela primeira vez, em clima subtropical, a existência de atividade da fosfolipase A₂ no plasma seminal de bodes, que promoveu a deterioração da viabilidade espermática em diluidores à base de leite.

O espermatozóide caprino é sensível ao choque térmico, o que causa a morte de inúmeros espermatozóides durante o processo de preservação a baixas temperaturas (SAHNI & ROY, 1972). O diluidor tem como função proteger a membrana do espermatozóide contra o choque térmico e às injúrias mecânicas causadas pelo transporte do sêmen, além de fornecer nutrientes e estabilizar o pH do meio (MCDONALD, 1947; CUNHA & LOPES, 2000, VERSTEGEN *et al.*, 2005). Portanto, diversas opções têm sido propostas para formulação de diluidores capazes de melhor conservar o sêmen a 5°C. Dentre os diluidores naturais destaca-se o leite de vaca utilizado na forma integral, desnatado, reconstituído e ultrapasteurizado (UHT) (EVANS & MAXWELL, 1987). Os diluentes mais comumente utilizados para criopreservação do sêmen caprino contêm gema de ovo ou leite desnatado. No entanto, a diluição do sêmen caprino em diluidores contendo gema de ovo ou leite pode ser prejudicial para a célula espermática (ROY, 1957; NUNES *et al.*, 1982).

O emprego da água de coco simplificou a tecnologia do sêmen caprino no estado líquido a 5°C utilizado no Nordeste do Brasil, evitando a lavagem do sêmen após a colheita para retirada da enzima fosfolipase do tipo A que reage contra os fosfolipídios do diluidor (gema de ovo ou leite) (NUNES, 1988).

Os diluentes sintéticos contêm TRIS ou citrato como tampões, glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo contra choques térmicos. PERTRUZZI *et al.* (1976) observaram que o TRIS e o citrato foram superiores aos diluentes a base de leite após 24h de armazenamento a 5°C.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Principais constituintes do plasma seminal e sua ação sobre os espermatozóides durante a ejaculação

Por várias razões, a bioquímica do plasma seminal dos mamíferos tem recebido considerável atenção, seja pela sua capacidade de influenciar a fertilidade potencial do espermatozóide ou pelo fato de que alguns constituintes seminais tenham suas origens em órgãos específicos, cujas concentrações são importantes para avaliar a capacidade secretora de várias glândulas sexuais anexas, as quais dependem da produção de andrógenos pelos testículos para desempenhar suas funções (MANN, 1974).

Há muito tempo que o sêmen tem sido objeto de intensas investigações bioquímicas, mas apesar dos consideráveis avanços, os conhecimentos sobre a função do plasma seminal ainda são obscuros. As modificações que ocorrem após o tratamento *in vitro* ocasionam variações do metabolismo e/ou sobrevivência dos espermatozóides. Além disso, a inexistência de mecanismos de eliminação das células espermáticas mortas submete os gametas vivos a uma convivência com os produtos de sua decomposição (CORTEEL, 1980). SKANDHAN (1981) reconheceu que as alterações de muitos dos componentes do plasma seminal são responsáveis pela incapacidade de fecundação do gameta.

O plasma seminal contém uma variedade de constituintes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos dentro do mecanismo de regulação da função do espermatozóide, entretanto as exatas funções destes componentes seminais no controle da motilidade espermática, ainda não estão bem elucidadas (STREZEZEK *et al.*, 1992). O contato com o fluido seminal desencadeia eventos preparatórios nos espermatozóides para a fertilização (MÜLLER *et al.*, 1997), pois os constituintes do plasma seminal são conhecidos por modular uma variedade de funções espermáticas (CALVETE *et al.*, 1994).

Alguns estudos demonstram haver diferenças na qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes entre as estações do ano em clima temperado (EATON & SIMMONS, 1952; COLAS, 1980; NUNES, 1982; COLAS, 1983; ROCA *et al.*, 1992; TULI e HOLTZ, 1995), e muitos deles atribuíram tais diferenças ao fotoperíodo. Em ovinos, a frequência de colheita pode influenciar a composição iônica e a atividade enzimática no plasma seminal, bem como, os parâmetros espermáticos e produção diária de espermatozóides (KAYA *et al.*, 2002).

Relatos em várias espécies sugerem que o plasma seminal contenha fatores que influenciam a fertilidade do macho (AURICH *et al.*, 1996). Estes estudos são geralmente

baseados na comparação do plasma seminal entre machos com fertilidade diferente (AURICH *et al.*, 1996) ou sobre o isolamento de fatores do plasma seminal que facilitam ou inibem a capacitação espermática e a fertilização (OLLERO *et al.*, 1997). AURICH *et al.* (1996) demonstraram que a adição de plasma seminal de diferentes garanhões afetou a resistência de espermatozóides em suportar a congelação e descongelação. HENAULT *et al.* (1995) demonstraram que a adição de plasma seminal aos espermatozóides da cauda do epidídimo de touros aumentou a fertilidade, quando comparado à fertilidade dos espermatozóides epididimários sem a adição do plasma seminal.

Estudos previamente realizados demonstraram haver diferenças entre as membranas espermáticas dos espermatozóides epididimários e do ejaculado, devido à influência do plasma seminal (HENAULT *et al.*, 1995). Estas observações sugerem que alguns fatores presentes nas secreções das glândulas anexas aumentam a fertilidade de touros de alta fertilidade ou alguns fatores que inibem a fertilidade estão presentes em animais de baixa fertilidade (HENAULT *et al.*, 1995). Nesse sentido, as secreções das glândulas anexas dos touros e eqüinos são fatores determinantes para a fertilidade do macho (HENAULT *et al.*, 1995; AURICH *et al.*, 1996).

DOTT *et al.* (1979) demonstraram que a incubação do espermatozóide em altas taxas de diluição prejudica a motilidade, pois parece possível que haja algum fator essencial associado à célula para o desempenho da função espermática e que a proximidade das células é necessária para a provisão de níveis adequados deste fator. Tem sido sugerido que a presença do plasma seminal de caprinos no meio de conservação, interfere no comportamento dos espermatozóides em suportar a congelação (CORTEEL, 1974).

Talvez a principal razão desse impasse seja devido à grande diversidade do plasma entre as espécies, ocorrência e concentração de muitos constituintes seminais importantes (RODGER, 1975). Alguns estudos demonstraram haver ampla variação nos níveis bioquímicos de muitos constituintes do plasma seminal entre bovinos e bubalinos (DHAMI & SAHNI, 1993). Esta variação pode ser responsável pelas notáveis diferenças na qualidade, congelabilidade e fertilidade do sêmen nestas espécies (DHAMI & SAHNI, 1993). Esta diversidade não é somente encontrada entre as espécies de mamíferos, mas também entre as raças de uma mesma espécie, como observada em caprinos (EATON & SIMMONS, 1952; PINHEIRO *et al.*, 1996a). O problema é agravado pela falta de informação e desconhecimento da fisiologia do espermatozóide *in vivo*. Estas limitações têm resultado em contínua identificação de constituintes bioquímicos seminais e especulações sobre o papel de cada novo constituinte (RODGER, 1975).

2.1.1 Principais eletrólitos do plasma seminal e sua importância sobre o metabolismo espermático

Diversos eletrólitos estão presentes no plasma seminal e dentre os mais importantes foram encontrados Na^+ , K^+ , Mg^{++} (GONZALES *et al.*, 1984; PINHEIRO *et al.*, 1996a); Cl^- , fosfatos (DHAMI & SAHNI, 1993) e Zn^{++} (KVIST, 1980). Os níveis de cloreto no sêmen influenciam o potencial de membrana do espermatozóide e a motilidade em associação com cátions. Os íons Cl^- , Na^+ e K^+ estão diretamente relacionados com a manutenção da excitabilidade dos espermatozóides, pH ótimo do sêmen e pressão osmótica constante dentro e fora das células espermáticas (DHAMI & SAHNI, 1993). Em ovinos, a concentração de íons Na^+ , Cl^- e PO_4^- no plasma seminal excedem àquelas do espermatozóide, enquanto a de potássio, cálcio e magnésio são maiores no espermatozóide (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000).

Níveis mais altos de K^+ e Ca^{++} no espermatozóide causam redução na atividade espermática em ovinos nativos e Merinos. Os dados também sugerem uma relação recíproca entre o conteúdo intracelular de K^+ , Ca^{++} e PO_4^- com relação à percentagem de espermatozóides vivos, onde uma percentagem mais alta de células vivas foi associada com altos níveis de K^+ e Ca^{++} e baixa de PO_4^- (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000). Alguns autores constataram que o metabolismo espermático das células testiculares diferem daquela do ejaculado em muitos aspectos, visto que a adição de PO_4^- ao meio de incubação deprimiu a respiração do espermatozóide do ejaculado e estimulou as células do testículo (MANN & WHITE, 1957; O'SHEA & VOGLMAYR, 1970).

O'SHEA & VOGLMAYR (1970) observaram que a adição dos íons Mg^{++} e K^+ ao sêmen ovino aumentou a entrada de oxigênio, a oxidação da frutose e o acúmulo de lactato extracelular.

PINHEIRO *et al.* (1996b) constataram que os níveis de Ca^{++} , PO_4^- e Mg^{++} no plasma seminal do macho caprino podem variar conforme a época do ano (seca ou chuvosa) e a raça, sugerindo que a disponibilidade e qualidade do alimento entre os períodos chuvoso e seco, provavelmente influenciam o equilíbrio eletrolítico do sêmen desta espécie. KAYA *et al.* (2002) observaram que o aumento na frequência de colheita de sêmen em ovinos provocou um aumento significativo na concentração de Na^+ e K^+ no plasma seminal, todavia os níveis de Ca^{++} e Mg^{++} reduziram marcadamente. No mesmo estudo, observou-se uma redução progressiva da motilidade das células espermáticas no ejaculado e foi associado com as concentrações de Na^+ e K^+ .

O zinco é encontrado no próprio espermatozóide e no fluido seminal, onde sua concentração é consideravelmente maior do que em qualquer outro fluido corporal. No plasma seminal, sua origem principal é a próstata (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). KVIST (1980) demonstrou que a presença do Zn^{++} no plasma seminal previne a descondensação prematura da cromatina nuclear, preservando as células espermáticas para o estágio apropriado da transferência nuclear do genoma do macho, ou seja, o Zn^{++} espermático bloqueia a habilidade de descondensação da cromatina nuclear (NCD) do espermatozóide ejaculado, até este cátion ser removido, em estágios posteriores à transferência do genoma masculino.

Este estudo também sugere que há uma correlação direta entre o nível de zinco no fluido seminal e a motilidade do espermatozóide, ressaltando que pequenas quantidades destes elementos são essenciais para a manutenção da motilidade espermática. Uma fraca correlação positiva foi encontrada entre a percentagem de espermatozóides com movimento circular ou movimento progressivo não linear e a concentração de zinco (HENKEL *et al.*, 1999). Portanto, a motilidade espermática é significativamente influenciada pelo Zn, pois o Zn flagelar está localizado principalmente nas fibras densas internas e estes elementos estruturais são quimicamente modificados durante a maturação espermática epididimária (eliminação do Zn), pois um baixo conteúdo de Zn nas fibras densas internas após o trânsito epididimário é requerido para realizar o enrijecimento das mesmas (HENKEL *et al.*, 1999). O enrijecimento das fibras pela formação de pontes dissulfeto, durante a maturação espermática no epidídimo, parece ser uma etapa fisiológica essencial para a geração da motilidade, especialmente a motilidade progressiva (HENKEL *et al.*, 1999).

A distribuição da maioria dos íons entre a fração espermática e o plasma seminal poderá promover as bases para a variação da qualidade do sêmen e deverá ser considerada na interpretação dos resultados obtidos na avaliação da fertilidade de ovinos (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000).

2.1.2 Proteínas e enzimas do plasma seminal e sua ação sobre os espermatozóides

FRAZER & BUCCI (1996) afirmaram que o plasma seminal é composto de açúcares, lipídios e minerais, bem como de um elevado teor de proteínas especiais, incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, inibidores, imunossuppressores, substâncias ligadas a andrógenos, inibina e imunoglobulinas, onde a presença ou ausência de muitos destes componentes pode estar envolvida com a fertilidade.

Estudos demonstraram que alguns componentes do plasma seminal são adsorvidos sobre a superfície das células espermáticas durante a ejaculação, tais como as proteínas (CALVETE *et al.*, 1994; OLLERO *et al.*, 1997), que estão presentes no plasma seminal e cuja proporção pode variar entre os indivíduos de uma mesma espécie (FRAZER & BUCCI, 1996).

Assim também, diferentes variedades de proteínas medeiam a ligação com a heparina e a superfície espermática em diferentes espécies animais. A possibilidade de que a maioria das proteínas heparina-ligantes do plasma seminal possa agir como fatores de capacitação espécie-específico merecem maiores estudos (CALVETE *et al.*, 1994).

Em eqüinos, o aumento da concentração de proteínas no sêmen pouco concentrado diminui a congelabilidade do mesmo (BITTMAR & KOSINIAK, 1992). Em touros, a estimulação dos níveis de lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AAT), fosfatase alcalina, fosfatase ácida e outras enzimas, podem ser utilizadas para avaliar a qualidade, descongelabilidade e fertilidade do sêmen, podendo assim ajudar na seleção de touros para uso em inseminação artificial (DHAMI & KODAGALI, 1987). Em ovinos, uma intensa atividade de colheita de sêmen resulta em um aumento na atividade de AAT e piruvato-glutâmico transferase (GPT) no plasma seminal, em contraste com a LDH que teve atividade reduzida (KAYA *et al.*, 2002).

Uma atividade elevada de AAT e GPT mensuradas no plasma seminal é indicativa de dano ou de função alterada na membrana, que ocorre devido, provavelmente, à maturação inadequada no epidídimo, como conseqüência do aumento da freqüência de colheita (KAYA *et al.*, 2002). Já a redução da atividade da LDH pode resultar da síntese reduzida no tecido testicular e pode indicar distúrbios da função do parênquima testicular, bem como mudanças no metabolismo espermático (KAYA *et al.*, 2002).

As proteínas do plasma seminal exercem múltiplos efeitos sobre a função espermática e desempenham um importante papel na capacitação dos espermatozóides, traduzido por um complexo processo que habilita a célula espermática a penetrar, através da zona pelúcida, por meio da reação acrossômica (CALVETE *et al.*, 1994).

BITTMAR & KOSINIAK (1992) descreveram que a habilidade fertilizante do espermatozóide seria, em grande parte, determinada pelas proteínas espermáticas localizadas no acrossoma e peça intermediária, conhecidas como fonte de enzimas metabólicas especialmente ativas, cujas liberações em grandes quantidades podem indicar danos na membrana plasmática do espermatozóide.

Alguns aminoácidos presentes no plasma seminal de ovinos, tais como a taurina e hipotaurina, parecem ter efeito positivo sobre a fertilidade. É possível que o melhoramento

observado nas características de motilidade dos espermatozoides ovinos congelados na presença da taurina, possa ser devido a outros fatores que não sejam suas propriedades antioxidantes (SÁNCHEZ-PARTIDA *et al.*, 1997).

2.1.3 Frutose e ácido cítrico no plasma seminal

Apesar do fato da célula espermática não dispor de um grande número de organelas envolvidas com os processos do metabolismo energético, os mesmos possuem as enzimas necessárias para que ocorram as reações próprias do processo de respiração celular como a glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico, a oxidação dos ácidos graxos, o transporte eletrônico e possivelmente o desvio monofosfato hexose (MANN, 1974).

A principal função da frutose é suprir a vida energética do espermatozoide na forma de um material facilmente fermentável. Apesar disso, sabe-se que em aerobiose, a frutólise não é a única fonte de energia para o espermatozoide, que mesmo sendo privado de frutose, pode sobreviver na presença de O₂ devido à utilização de outras substâncias (MANN, 1946). Todavia, em condições anaeróbicas, o espermatozoide depende amplamente da frutose, e a cessação da frutólise, invariavelmente termina sua atividade (MANN, 1946).

A frutose é produzida pelas glândulas vesiculares, porém em animais que não as possuem a reserva energética de frutose é suprida pela próstata, como observado em coelhos (MANN, 1946). Alguns autores sugerem que a frutose seminal comporta-se como um marcador das funções das vesículas seminais (LEWIS-JONES *et al.*, 1996), sendo necessária à sobrevivência e à motilidade inicial da célula espermática e que o ácido cítrico reflete a atividade secretora da próstata, mesmo que sua função ainda não esteja bem conhecida. Todavia, acredita-se que o ácido cítrico se comporte como um ativador da fosfatase ácida, sendo importante para a manutenção do equilíbrio osmótico, juntamente com o potássio e o sódio, favorecendo desse modo a atividade espermática (IBARRA & NAVARIDAS, 1992).

O ácido cítrico é um dos principais constituintes do plasma seminal e apresenta relação com os níveis de testosterona plasmática, ocorrendo em altas concentrações na maioria das espécies de mamíferos, por constituir-se em um agente regulador necessário em muitos sistemas bioquímicos, tendo portanto, elevada importância para o metabolismo e motilidade espermática (POLAKOSKI & KOPTA, 1982).

A formação de frutose na vesícula seminal depende essencialmente de duas vias metabólicas: uma que deriva da glicose sanguínea e outra que é consequência do metabolismo do sorbitol (MANN, 1974). Esta se constitui num componente seminal importante para o

metabolismo do espermatozóide e seu nível reflete na qualidade espermática, na atividade metabólica e na função normal secretora da glândula vesicular (DHAMI & SAHNI, 1993).

SINGH & PENBEY (1995), avaliando a correlação existente entre os níveis de testosterona plasmática e a quantidade de alguns constituintes bioquímicos do plasma seminal, observaram que altas concentrações do andrógeno, não somente conduziam a uma melhor demonstração da libido, como também eram responsáveis pela elevação dos níveis de frutose e ácido cítrico no sêmen de caprinos. HIROE *et al.* (1960) afirmaram que a condição de armazenamento do plasma seminal, a frequência de ejaculações, o nível de glicose no sangue e a condição nutricional podem interferir fortemente na produção e metabolismo da frutose.

ROCA *et al.* (1993), observando o efeito da variação estacional sobre os níveis de frutose e ácido cítrico no plasma seminal de caprinos da raça Murciana-Granadina, na Espanha, constataram uma variação sazonal em ambos componentes do plasma seminal. Os níveis de frutose e ácido cítrico foram mais altos no verão e outono (dias curtos) e mais baixos na primavera (dias longos). O inverno foi considerado um período transicional.

PINHEIRO *et al.* (1996a), com o objetivo de determinar os parâmetros bioquímicos normais no plasma seminal de caprinos criados no Nordeste do Brasil, em machos das raças Alpina, Moxotó e mestiços Alpina-Moxotó, observaram que os valores encontrados para frutose, ácido cítrico e proteína total foram inferiores na época seca. Entretanto, em ambas as épocas, o tipo racial Moxotó mostrou valores sempre mais elevados, correlacionando os níveis de frutose e ácido cítrico com a maior disponibilidade de alimento ocorrida durante a época chuvosa.

2.1.4 Fosfolipase A₂

2.1.4.1 Caracterização das fosfolipases

As fosfolipases A₂ (PLA₂) ou fosfatidil-acil-hidrolase são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação acil-éster, na posição sn-2 de fosfoglicerídeos. Esta reação libera quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. De modo geral a ativação da PLA₂ depende de sua interação com grandes agregados lipídicos, em interfaces de lipídeo/água, o que permite a difusão do substrato para o sítio ativo (CHACUR, 2004). No PS de bovinos, o nível de PLA₂ foi purificado e caracterizado como uma enzima de 60 KDa (SOUBEYRAND, 1997).

Ainda segundo CHACUR (2004), diversas fosfolipases A₂ têm sido identificadas, baseado na localização, regulação, seqüência de gene e estrutura. Atualmente, as fosfolipases A estão divididas em 12 grupos, com base na estrutura primária e na presença de pontes dissulfídicas intramoleculares.

UPRETI *et al.*, (1999) afirmaram que a PLA₂ é uma enzima encontrada em diversos locais do organismo animal. Estudos morfológicos em espermatozóides tratados com lisolecitina revelaram a fusão do acrossoma e membrana plasmática durante a reação de acrossoma (como pré-requisito para a habilidade fertilizante do espermatozóide). Conseqüentemente, o papel potencial da PLA₂ na reação de acrossoma e controle da fertilização em mamíferos tem sido evidenciado durante a capacitação espermática em hamster dourado. A ativação da PLA₂ é induzida pelo cálcio bem como a reação de acrossoma, e ambos os processos são inibidos pelo zinco (THAKKER *et al.*, 1983). As PLA₂ no sêmen são dependentes de cálcio, tendo pH ótimo em torno de 7,0 a 8,5 e são inibidas por zinco e magnésio. Baseado nesses achados sugere-se que a PLA₂ espermática possa ter ação moduladora da fusão da membrana nos eventos da fertilização em mamíferos (UPRETI *et al.*, 1999).

A PLA₂ não foi identificada na superfície dos espermatozóides epididimários de bovinos (RONKKO, 1992), sugerindo que diferentes PLA₂ possam estar presentes no PS, e que a PLA₂ possa ligar-se à superfície espermática durante a ejaculação (ROLDAN, 1998). Os mesmos autores sugerem que seria interessante verificar se a quantidade da atividade da PLA₂ detectada no espermatozóide corresponde às da PLA₂ do PS que estão ligadas à superfície espermática.

2.1.4.2 Ação da fosfolipase no sêmen caprino

A ação da fosfolipase no sêmen caprino catalisa a hidrólise de lecitinas em lisolecitinas produzindo ácidos graxos livres. As lisolecitinas, devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática e os ácidos graxos são consideradas tóxicas aos espermatozóides. Em adição, a lecitina é o principal fosfolipídio nas membranas plasmáticas dos espermatozóides e está contida na gema de ovo, sendo portanto, substrato perfeito para ação hidrolítica da fosfolipase (ARAÚJO & CAMPOS, 2005). A principal fosfolipase ativa mensurada no sêmen caprino é a fosfolipase do tipo A1, enquanto que a fosfolipase do tipo A₂ tem sido relatada em outras espécies, incluindo a humana (KUNZE *et al.*, 1974).

A atividade da fosfolipase A pode ser mensurada por meio do decréscimo de lecitina, pelo aumento da liberação de ácidos graxos livres ou pelo aumento das lisolecitinas no PS (HAYAISHI, 1955). Em regiões de clima temperado, há um significativo efeito individual do macho caprino em relação ao efeito da fosfolipase A. Sua atividade depende da presença de cálcio, de pH ótimo, temperatura, concentração da mesma no plasma seminal, estação do ano e até mesmo da espécie de ave que fornece a gema de ovo para o preparo do diluidor (MANN & LUTWAK-MANN, 1981, CHEMINEAU *et al.*, 1991). Durante a estação não reprodutiva, as glândulas bulbouretrais hipertrofiam e aumentam sua atividade, sob influência das altas concentrações plasmáticas de prolactina e produzem mais fosfolipase A (NUNES, 1982).

SIAS *et al.*, (2005) mostraram que a GoPLRP₂ ou BUSgp 60 também dispara uma atividade da fosfolipase, e que esta enzima é provavelmente idêntica a “enzima da coagulação da gema de ovo”, descrita primeiramente por ROY (1957). O artigo de ROY sobre a “enzima de coagulação da gema de ovo no sêmen e glândulas de Cowper de caprino” foi provavelmente o primeiro relato sobre a PLRP₂ (ROY, 1957). Já que a GoPLRP₂ está presente no PS de caprino, esta enzima pode estar associada com a atividade reprodutiva de caprinos.

2.2 Conservação do sêmen no estado líquido

A tecnologia de resfriamento do sêmen é de grande interesse por ser capaz de manter o sêmen fértil por um a três dias e por permitir o transporte (BATELLIER *et al.*, 2001). Entretanto, quando o sêmen é armazenado a baixas temperaturas, deve-se ter cuidado para não submeter os espermatozoides ao choque térmico (SALAMON & MAXWELL, 2000), pois a preservação eficiente das células espermáticas com boa habilidade fertilizante é de grande importância para a utilização do sêmen (YOSHIDA, 2000). CHANTLER *et al.* (2000) mostraram que a separação dos espermatozoides do plasma seminal, resfriamento a 5°C, e posterior aquecimento a 37°C não causaram nenhuma mudança na motilidade. Todavia, poderiam afetar outras funções espermáticas, sugerindo que a motilidade somente não é confiável para predizer a condição fisiológica do espermatozoide.

O resfriamento a 5°C revelou que os microtúbulos dos espermatozoides humanos estabilizaram, mas o processo de resfriamento pode alterar algumas propriedades físicas da membrana plasmática, bem como outros aspectos da função espermática podem ser afetados pelo resfriamento (CHANTLER *et al.*, 2000).

Mesmo que a integridade da membrana espermática permaneça favoravelmente bem preservada por vários dias, durante o armazenamento líquido, a motilidade declina muito rapidamente (DE PAUW *et al.*, 2003). A motilidade do espermatozóide, em comum com outros processos biológicos, é sensível a temperaturas e diminui progressivamente quando o sêmen é resfriado (CHANTLER *et al.*, 2000). Danos irreversíveis no micromotor flagelar, e no DNA mitocondrial e nuclear, são provavelmente a principal razão pela qual o sêmen armazenado à temperatura ambiente tem um declínio do potencial fertilizante (DE PAUW *et al.*, 2003). CURRY & WATSON (1994) demonstraram que um certo grau de células são danificadas durante a fase de resfriamento.

Há inúmeros fatores que interferem na reação do espermatozóide ao resfriamento, sendo os mais importantes, o ambiente iônico e a taxa de resfriamento (CHANTLER *et al.*, 2000). Surpreendentemente, a membrana plasmática do espermatozóide parece mais capaz de resistir ao dano causado pelo pH (4,0 – 5,0), que os mecanismos responsáveis pela motilidade (DE PAUW *et al.*, 2003). Uma possível explicação é que o pH intracelular do espermatozóide diminuiu em função do pH extracelular. Isto sugere, que o espermatozóide tem uma habilidade mínima para manter seu pH em um ambiente ácido, e que a membrana é permeável a prótons (DE PAUW *et al.*, 2003).

A despeito do diluidor, da taxa de diluição, da temperatura ou condições de armazenamento, o espermatozóide se deteriora à medida que a duração do armazenamento aumenta (SALAMON & MAXWELL, 2000). As principais mudanças que ocorrem durante o armazenamento incluem redução na motilidade e integridade morfológica dos espermatozóides (SALAMON & MAXWELL, 2000). Uma das principais causas da deterioração espermática é o estresse oxidativo (BATELLIER *et al.*, 2001). De fato, as células espermáticas são caracterizadas por sua capacidade incomum de gerar metabólitos oxigênio-reativos, que causam peroxidação lipídica, especialmente durante a sobrevivência espermática (SALAMON & MAXWELL, 2000; BATELLIER *et al.*, 2001). Altos níveis de peroxidação lipídica da membrana plasmática podem modificar grandemente a fluidez da membrana, levando a modificações dramáticas na permeabilidade da membrana e morte celular (BATELLIER *et al.*, 2001). Os eventos acima são acompanhados pelo declínio no transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo e redução da fertilidade (SALAMON & MAXWELL, 2000; BATELLIER *et al.*, 2001).

É possível que o processo de armazenamento líquido antecipe a maturação das membranas espermáticas, aumentando então, a proporção de células espermáticas capacitadas

e com acrossomas reagidos (SALAMON & MAXWELL, 2000). Espermatozóides capacitados têm viabilidade reduzida e vida fértil limitada (SALAMON & MAXWELL, 2000) ou podem conferir incapacidade de fertilização se eles envelhecerem no trato reprodutivo das fêmeas após inseminação cervical (MAXWELL & WATSON, 1996). É portanto, provável que cuidados com resfriamento e reaquecimento do sêmen possam evitar os problemas associados com o choque térmico sem comprometer os resultados de análise do sêmen (CHANTLER *et al.*, 2000).

Um aumento na pressão osmótica tem influência sobre a integridade da membrana espermática, pois leva a uma desidratação celular, com conseqüente dano na membrana (DE PAUW *et al.*, 2003). Os estudos também têm demonstrado que a idade do espermatozóide *in vitro* leva a uma grande incidência de injúrias na mitocôndria do que no DNA nuclear (DE PAUW *et al.*, 2003).

A concentração espermática também influencia grandemente a sobrevivência dos espermatozóides, pois concentrações muito elevadas diminuem a sobrevivência espermática (DE PAUW *et al.*, 2003). Além disso, a inexistência de mecanismos de eliminação das células espermáticas mortas, submete os gametas vivos a uma convivência com os produtos de sua decomposição (CORTEEL, 1980). Espermatozóides bovinos ejaculados e armazenados preservam a integridade da membrana, mesmo em concentrações mais baixas (DE PAUW *et al.*, 2003), sugerindo que houve uma redução na quantidade de produtos metabólicos tóxicos ou uma exaustão mais lenta dos substratos a altas diluições (DE PAUW *et al.*, 2003).

2.2 Problemática da conservação do sêmen caprino

Espermatozóides caprinos são susceptíveis a choque térmico, o que causa a morte de inúmeras células durante o processo de preservação a baixas temperaturas, embora o grau de suscetibilidade seja menor que o observado em espermatozóides de javali (SAHNI & ROY, 1972)

Os diluentes mais comuns utilizados para criopreservação do sêmen caprino contêm gema de ovo ou leite desnatado. No entanto, a diluição do sêmen caprino em diluidores contendo gema de ovo ou leite pode ser prejudicial para a célula espermática. A interação prejudicial entre o plasma seminal e a gema de ovo foi documentada pela primeira vez por ROY (1957) e com leite por NUNES *et al.* (1982). ROY (1957) observou que as células espermáticas mantinham sua motilidade em diluidores com gema de ovo, se o plasma seminal

fosse retirado, mas se o sêmen integral fosse adicionado a um diluidor contendo gema de ovo, esta coagulava e os espermatozóides morriam. Também foi determinado que a gema de ovo coagulava devido a uma enzima originada na glândula bulbouretral, denominada enzima de coagulação da gema de ovo (EYCE – do inglês: egg yolk-coagulating enzyme). Da mesma forma, NUNES *et al* (1982) identificaram uma proteína (SBUIII) da glândula bulbouretral de bodes, que diminuía a sobrevivência de espermatozóides resfriados e congelados em diluidores à base de leite.

A remoção do plasma seminal lavando o espermatozóide com um tampão isotônico foi descrito para melhorar a qualidade de sêmen caprino durante preservação a várias temperatura (IRITANI *et al.*, 1961; DEKA & RAO, 1986; MISRA *et al.*, 1993).

Para a lavagem, a amostra de sêmen é diluída em solução tamponada e submetida à centrifugação em temperatura ambiente (24,27 °C) por 10 min à 3000g. O sobrenadante é aspirado com a ajuda de uma pipeta Pasteur. A solução tamponada é então adicionada ao sedimento até restabelecer o volume inicial e centrifugado novamente. Depois da segunda lavagem, o sedimento é ressuspensionado utilizando um diluidor tamponado. (ISLAM *et al.*, 2006).

O armazenamento de sêmen caprino em diluidor contendo gema de ovo é problemático devido à presença, no plasma seminal, da fosfolipase A (enzima de coagulação da gema de ovo) produzida pelas glândulas bulbouretrais que catalisa a hidrólise da lecitina da gema de ovo para ácidos graxos e lisolecitinas, os quais são tóxicos para os espermatozóides (ROY, 1957; IRITANI & NISHIKAWA, 1964; AAMDAL *et al.*, 1965). Então, a remoção de plasma seminal é recomendada quando o espermatozóide de caprinos é preservado a baixas temperaturas em um diluente contendo gema de ovo (CORTEEL, 1992).

ROCA *et al* (1997) mostraram que o sêmen de caprinos da raça Murciano-Granadina não lavado pode ser preservado à 5°C depois de diluição em TRIS com 2% gema de ovo. Este achado está de acordo com os relatados previamente por RITAR & SALAMON (1982; 1991), que mostraram que gema de ovo a 1,5% no sêmen diluído não apresentava efeito depressor na viabilidade de sêmen não-lavado de Angorá colhidos fora da estação de monta ou no fim dela. Porém, os autores anteriores indicaram que o efeito de produtos tóxicos durante incubação tornou-se aparente com a concentração de gema de ovo aumentada. MEMON *et al.* (1985) reportaram uma deterioração drástica na sobrevivência celular pós-descongelção, quando o sêmen não lavado foi diluído em um diluidor com 11% de gema de ovo. Por outro lado, CHAUAN & ANAND (1990) em bodes Jamunapari, e AZAWI *et al.*, (1993) em bodes Shami, mostraram que o sêmen não lavado pode ser preservado a baixas temperaturas depois

de diluído em TRIS com uma concentração alta de gema de ovo. Além disso, CHAUAN & ANAND (1990) alcançaram alta taxa de fertilidade com sêmen congelado-descongelado não lavado.

2.4 Diluidores

Um dos principais objetivos em um programa de inseminação artificial é produzir um grande número de descendentes de animais geneticamente superiores e assim, melhorar a qualidade da raça, sendo necessários métodos de diluição e armazenamento de sêmen. Diluidores de sêmen têm que prover material nutriente para o espermatozóide, além de possuir uma capacidade tamponante para neutralizar os produtos de seu metabolismo e assim, manter um pH adequado para sua sobrevivência (MCDONALD, 1947).

O primeiro diluidor desenvolvido simplesmente aumentava o volume do ejaculado que deveria ser imediatamente utilizado, a fim de se obter resultados satisfatórios. Um deste diluidores era o S.G.C.2 de Melovanov. O desenvolvimento do tampão fosfato-gema de Phillips de Wisconsin foi um dos desenvolvimentos mais importantes para a inseminação artificial. Consiste em fosfato de potássio e sódio em quantidades adequadas, dissolvidas em água bidestilada. Esta solução é misturada com uma quantidade igual de gema de ovo fresco. O sêmen diluído com este material pode ser usado com sucesso por vários dias após a colheita, se armazenado sob condições apropriadas. O diluidor citrato-gema tem substituído quase completamente o fosfato-gema, pois propicia um exame microscópico mais fácil do sêmen diluído. Certos países europeus utilizavam um diluidor de fosfato-glicose-gelatina. O sêmen diluído é solidificado em cilindros semelhante a canudos de refrigerante. Uma porção de um destes cilindros é depositada na cérvix da vaca com um instrumento especial onde se dissolve. Este diluidor não é, porém, tão satisfatório quanto o citrato-gema ou fosfato-gema (MCDONALD, 1947).

Os diluidores sintéticos mais comumente utilizados para diluir sêmen de carneiro, para IA vaginal ou cervical contém como tampão o TRIS ou o citrato, glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo para proteger a membrana espermática contra o choque térmico. Estes diluentes também são utilizados para o sêmen caprino, porém com menor quantidade de gema de ovo, para evitar que se desenvolva uma reação enzimática, como consequência da atividade de uma enzima presente no PS desses animais que coagula a gema de ovo. A concentração dessa enzima varia entre os diferentes machos caprinos e é mais elevada quando se obtém o sêmen por eletroejaculação. Este problema pode ser resolvido das

seguintes formas: (I) utilizando menor concentração de gema de ovo no diluidor; (II) utilizando um meio que não contenha gema de ovo (por exemplo, leite) ou (III) descartando o plasma seminal, por centrifugação, eliminando essa enzima. (EVANS & MAXWELL, 1990).

Quando se preparam os diluidores, as substâncias químicas devem ser pesadas em primeiro lugar e dissolvidas em uma proveta de 100 mL, adicionando-se 75-80 mL de água destilada (para carneiro) e 90 a 95 mL (para macho caprino). Adicionar a gema de ovo e elevar ao volume final com água destilada. Os ovos que se utilizam para obter a gema não devem ter mais de quatro a cinco dias. (EVANS & MAXWELL, 1990).

2.4.1 Diluidor TRIS-Gema (TG)

TRIS é uma abreviação da combinação orgânica conhecida como trishydroxymethylaminomethane, com a fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Em bioquímica, TRIS é extensamente usado como um componente tampão de solução, especialmente para solução de ácidos nucleicos. É uma amina primária e, assim, sofre as reações associadas com aminas típicas, por exemplo, condensação com aldeídos.

TRIS tem um pK_a de 8,3 (a 20 °C), o que determina um tamponamento efetivo na faixa de pH entre 7,0 e 9,2. Sendo ligeiramente básico, o TRIS se torna um tampão efetivo para soluções ligeiramente básicas, o que mantém o DNA desprotonado e solúvel em água. O TRIS é comumente combinado a EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para formar o "tampão TE" para estabilização e armazenamento de DNA (MARKOFISKY, 2002).

O TRIS é um diluente amplamente utilizado, em concentrações de 10 a 15mM não apresenta efeito sobre motilidade e metabolismo dos espermatozoides de carneiros (SALAMON & MAXWELL, 2000). Na literatura soviética, o TRIS é recomendado para congelamento de sêmen, sendo que para tal, o mesmo deve ser acrescido de gema de ovo (crioprotetor para resfriamento a 5°C) e glicerol (crioprotetor para congelamento abaixo de 0°C) (EVANS & MAXWELL, 1990). De fato, a combinação TRIS-gema foi mais eficiente em preservar a motilidade dos espermatozoides após congelamento/descongelamento quando comparado ao leite-gema (CHAUAN & ANAND, 1990). Estes autores descreveram ainda que a taxa de fertilidade do sêmen diluído em TRIS-gema, após descongelamento foi na ordem de 80% em cabras inseminadas duas vezes: uma logo ao ser detectado o cio natural e a segunda 12h depois. Já ROCA *et al.* (1997) descreveram fertilidade de 74% em cabras com estro sincronizado e inseminadas com sêmen diluído em Tris-gema (2%) resfriado.

ISLAM *et al.* (2006) trabalhando com sêmen caprino diluído em TRIS-gema, verificaram que este diluidor não causou formação de “pallet” durante a centrifugação. A formação do “pallet” é provavelmente devido a danos na membrana espermática que tornam a célula viscosa.

A composição do diluidor TG está expressa no quadro 1.

Quadro 1: Composição do diluidor TG

	Macho Ovino	Macho Caprino
TRIS(hidroximetil)aminometano (g)	3,634	3,634
Frutose (g)	0,50	0,50
Ácido cítrico (monohidratado) (g)	1,99	1,99
Gema de ovo (mL)	14	2,5
Água destilada q.s.p. (mL)	100	100

Fonte: S. Salamon. “Inseminación artificial de ovejas y cabras”, 1990

2.4.2 Diluidor Citrato-Gema (CG)

Citrato é a designação genérica dos sais de ácido cítrico. O citrato de sódio é amplamente utilizado como tampão de diluidores de sêmen com a finalidade de manter o pH ideal para a sobrevivência espermática.

O CG consiste em uma solução de citrato de sódio misturado com gema de ovo fresca. A adição de 300 mg, de sulfanilamida a 100 mL de solução de citrato mostrou aumentar a taxa de concepção a campo em 3 a 4%, devido ao crescimento bacteriano reduzido no sêmen diluído (MCDONALD, 1947). EVANS & MAXWELL (1990) adicionam, ainda, glicose como fonte de energia (quadro 2).

MILCZEWSKI *et al.* (2000) utilizaram diluidor à base de citrato-gema, em ovinos, obtendo 55,22% de motilidade progressiva após 8h de armazenamento a 5°C, sendo superior ao TRIS-gema (42,17%). Após 4h de teste de termorresistência (TTR), a motilidade dos espermatozoides diluídos em CG caiu para 50%, enquanto que para os espermatozoides diluídos em TG, a motilidade chegou a 35% e em leite-UHT-gema a 2,2%.

Alguns autores relataram que a adição de glicina ao diluidor CG prolongou a sobrevivência de espermatozóides de carneiros armazenados a 4°C. Porém, a utilização de diluidor citrato-gema acrescido de glicina não apresentou vantagem quando comparado com diluidor citrato-gema tradicional (MAXWELL & SALAMON, 1993; MILCZEWSKI *et al.*, 2000).

Quadro 2: Composição do diluidor CG

	Macho Ovino	Macho Caprino
Citrato sódico (2H ₂ O) (g)	2,37	2,37
Glicose (g)	0,80	0,80
Gema de ovo (mL)	20	2,5
Água Destilada q.s.p. (mL)	100	100

Fonte: Maxwell & Evans. "Inseminación artificial de ovejas y cabras", 1990

2.4.3 Água de coco

A água de coco é uma solução estéril, ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fitormônios) e pouquíssimos fosfolipídeos. Sua composição é muito próxima do soro sanguíneo (MARQUES, 1982). É um excelente meio de diluição e conservação do sêmen de várias espécies. De fato, a água de coco favorece a sobrevivência e a motilidade dos espermatozóides conservados no estado líquido. (NUNES & COMBARNOUS, 1995).

Os lipídeos do coco são menos tóxicos e favorecem a motilidade dos espermatozóides, pois são ricos em ácidos graxos saturados, enquanto que os da gema de ovo, ricos em ácidos graxos insaturados são mais tóxicos e mais lesivos às membranas espermáticas (UPRETI *et al.*, 1996)

DUA & CHANDRA (1993) isolaram e identificaram na água de coco substâncias reguladoras do crescimento de plantas, como as citoquininas endógenas e o ácido 3-indol-acético. Esta última tem uma ação benéfica sobre a sobrevivência e motilidade do sêmen humano, ovino e caprino (NUNES & COMBARNOUS, 1995).

O emprego da água de coco simplificou a tecnologia do sêmen caprino no estado líquido a 4°C utilizado no Nordeste do Brasil, evitando a lavagem do sêmen após a colheita para retirada da enzima fosfolipase do tipo A que reage contra os fosfolipídios do diluidor

(gema de ovo ou leite) (NUNES, 1988). Os resultados *in vitro* com o sêmen conservado a 4°C mostraram uma boa percentagem de espermatozóide móveis com uma boa motilidade em associação com uma boa fertilidade com a inseminação cervical (75% ao parto) (SALLES, 1989; LIMA, 1996).

Quadro 3: Composição do diluidor ACI

	Quantidade
Água de coco <i>in natura</i>	50mL
Citrato de sódio 2,5%	50mL
Gema de ovo	2,5%

2.4.4 Crioprotetores

Os crioprotetores são inclusos nos diluentes para minimizar o estresse químico e físico causado pelas variações de temperatura durante o resfriamento, congelação e descongelação dos espermatozóides. Os crioprotetores são classificados em penetrantes e não-penetrantes (PURDY, 2005).

A membrana plasmática dos espermatozóides é solúvel aos crioprotetores penetrantes, que entram nestas células, deslocando a água para fora da mesma, desidratando-a (AMMAN, 1999; PURDY, 2005). Desta forma, no momento da congelação, menos cristais de gelo serão formados no interior da célula, fornecendo menos risco de morte celular. Este mesmo autor explica que o crioprotetor penetrante funciona como um solvente para sais e açúcares.

Os crioprotetores não penetrantes agem no meio extra-celular, protegendo a célula no resfriamento até 5°C, podendo modificar a membrana do espermatozóide. Age também como soluto e diminui a temperatura de congelação do diluente. (AMMAN, 1999; PURDY, 2005)

Os crioprotetores não penetrantes e penetrantes têm efeito adicional, sendo que o primeiros fornecem proteção aos espermatozóides até 0°C, enquanto que os segundos agem em temperaturas abaixo desta (SALAMON & MAXWELL, 1995).

2.4.4.1 Gema de ovo

A gema de ovo, um componente comumente acrescentado aos diluentes, tem demonstrado efeitos benéficos no resfriamento do sêmen (GIL *et al.*, 2003), dentre os quais se

destaca a proteção contra choques térmicos em temperaturas próximas de 0°C, tanto durante a congelação, quanto durante a descongelação (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Já foi demonstrado que a adição de gema de ovo ao diluidor teve efeito benéfico sobre a percentagem de espermatozoides móveis no sêmen ovino, principalmente após rápido resfriamento do sêmen de 10 e 5°C (FISER & FAIRFULL, 1986). Todavia, alguns estudos indicam que a fração lipoprotéica de baixa densidade da gema de ovo é a fonte comum de proteção do espermatozoide ovino contra os efeitos do armazenamento a +5°C (WATSON & MARTIN, 1975). Os fosfolipídios da fração lipoprotéica da gema de ovo favorecem a proteção da membrana da célula espermática (WATSON, 1981). Já a proteína da fração lipoprotéica da gema de ovo serve para solubilizar o lipídio e ligá-lo à membrana da célula (WATSON, 1981). Mais recentemente, MOUSSA *et al.* (2002) demonstraram que a fração lipoprotéica da gema de ovo possui efetiva propriedade crioprotetora sobre os espermatozoides congelados-descongelados de touros, pois melhor motilidade espermática foi obtida com a adição da gema de ovo. Uma grande taxa de concentração de gema de ovo tem sido examinada em diluentes para a congelação do sêmen ovino (SALAMON & MAXWELL, 2000). Os trabalhos iniciais utilizaram 30-50%, mas subseqüentemente, os investigadores incluíram uma taxa mais baixa de concentração no diluente (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Contudo a gema de ovo é amplamente utilizada para criopreservação do sêmen desta espécie, sendo utilizada com bons resultados na concentração de 2 a 2,5% para sêmen resfriado (ROCA *et al.*, 1997; NUNES, 2002; CAMPOS, 2003; CAMPOS *et al.*, 2003b) e de 9 a 20% pra congelação. (CHAUHAN & ANAND, 1990; PÉREZ LLANO & MATEOS REX, 1995; GIL *et al.*, 2003; EIMAN *et al.*, 2004; CABRERA *et al.*, 2005). A ação de revestimento espermático, em menos de 5 minutos com a gema de ovo durante a diluição, tem um importante efeito sobre várias características após quatro dias de armazenamento em uma solução salina simples com pH 6 e 300 mOsm/ Kg (DE PAUW *et al.*, 2003), já que melhoramentos foram realizados pela proteção adicional do espermatozoide durante o armazenamento em meio contendo gema de ovo (DE PAUW *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICATIVA

A conservação do sêmen por períodos curtos é dependente da redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozóides a baixas temperaturas (MAXWELL & SALAMON, 1993; MACHADO & SIMPLÍCIO, 1995). No sêmen caprino pós-diluído, o ritmo de refrigeração deve estar compreendido entre 0,25 a 0,35°C/min até que seja atingida a temperatura de 5°C. Neste caso, a motilidade dos espermatozóides é mantida em baixos níveis por alguns dias (MACHADO & SIMPLÍCIO, 1995). No entanto, a estocagem do sêmen refrigerado em diluidores à base de citrato-gema ou leite desnatado não deve exceder oito horas, pois a partir deste momento mais de 50% da motilidade é perdida (SAHNI, 1987) e a capacidade fecundante do sêmen resfriado decresce geometricamente. Apesar disso, MATHEW *et al.*, (1982) preservaram sêmen caprino, em pH neutro e a uma temperatura de +5°C, por até 10 dias em diluente à base de TRIS, associado a 20 ou 25% de gema de ovo. Estudos têm demonstrado que a adição de fosfolipídios e lipoproteínas ao sêmen pode ter efeito estabilizador sobre a membrana (DEN DAAS, 1992). Essencialmente, o efeito parece ser o resultado de modificações na composição lipídica da membrana. Na maioria dos diluidores, usa-se gema de ovo ou leite como componente básico, uma vez que a proteção dos espermatozóides contra o choque térmico é provida pela fosfatidilcolina (lecitinas) e lipoproteínas da gema e pela caseína do leite (DEN DAAS, 1992).

Um outro aspecto a considerar-se é o açúcar presente no diluidor, pois a habilidade do espermatozóide em utilizar igualmente a frutose, a glicose ou manose deve-se ao fato de que estes três açúcares entram no ciclo da glicólise por meio da reação da hexoquinase com o ATP, seguido pela formação do monofosfatohexose até ácido láctico (MANN, 1945b; MANN, 1946; KING *et al.* 2006). Além disso, já é conhecido que a frutose é responsável por suprir a vida energética do espermatozóide, apesar de saber que em aerobiose a frutólise não é a única fonte de energia para o espermatozóide, que mesmo sendo privado de frutose, pode sobreviver na presença de O₂ devido à utilização de outras substâncias (MANN, 1946).

Diante do exposto, confirmou-se que não há dados consistentes na literatura científica acerca do efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal sobre a conservação do sêmen caprino a 5°C. Além disso, poucos estudos foram realizados utilizando os diluidores TG para conservação do sêmen caprino no estado líquido. Também não há relatos da presença da fosfolipase A₂ no plasma seminal de caprinos e de seus efeitos sobre a conservação em clima tropical e nem de sua importância sobre as características seminais e conservação do sêmen desta espécie. Desta forma, os conhecimentos destes dados poderão

contribuir para uma melhor compreensão sobre o metabolismo e a conservação dos espermatozoides de caprinos.

4. HIPÓTESE

1. O nível de frutose inicial no ejaculado caprino não interfere na qualidade do sêmen no estado fresco, e/ou conservado a 5°C por até 48 horas.

2. O tipo de diluidor utilizado na conservação do sêmen caprino não é influenciado pelo nível de frutose no plasma seminal.

3. A atividade de PLA₂ não interfere na escolha do diluidor

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a qualidade do ejaculado caprino conservado em três diferentes diluidores, cujo nível de frutose inicial no plasma seminal é conhecido.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar por meio do teste de termorresistência (TTR), ou seja, do vigor e da motilidade, a viabilidade do sêmen diluído no estado fresco (0 h) ou conservado por 2, 24 e 48 h a 5°C, nos diluidores Citrato-Gema, Tris-Gema ou Água de Coco Industrializada - Gema;
- Avaliar a morfologia espermática do sêmen diluído e conservado nos diluidores acima citados após 5 e 120 minutos de incubação a 38°C no estado fresco (0 h) ou conservado por 2, 24 e 48 h a 5°C;
- Determinar o nível de frutose e fosfolipase A₂ no sêmen caprino e sua possível influencia sobre o vigor, motilidade, TDM e morfologia espermática, nos diluidores citados anteriormente;
- Constatar se o nível inicial de frutose seminal exige diluidores diferenciados;
- Determinar a presença de atividade da PLA₂ no PS de caprinos.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido nas instalações do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Ceará), situado a 3° 45' 02'' de Latitude Sul, 38° 32' 35'' de Longitude Oeste, a 15,5m acima do nível do mar, e com um clima do tipo AW, quente e úmido, segundo a classificação de Koeppen. O experimento foi realizado durante os meses de junho e julho de 2007, apresentando neste período, temperatura média de $27,28 \pm 0,54^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar $75,75 \pm 4,88\%$. Os dados climatológicos foram cedidos pela estação meteorológica da FUNCEME/Campus do Pici.

6.2 Animais experimentais

Foram utilizados seis (6) machos caprinos Sem Padrão Racial Definido (SPRD), com idade média de $32,41 \pm 5,91$ meses, peso vivo médio de $36,22 \pm 6,91\text{Kg}$ e circunferência escrotal (CE) média de $24,73 \pm 1,53\text{cm}$, criados sob condições intensivas e alimentados segundo NRC(1981) para caprinos. A mineralização foi incorporada à ração e a água fornecida *ad libitum*. O controle sanitário (anti-helmíntico e suplementação vitamínica) foi realizado conforme critérios pré-estabelecidos pela Embrapa/ Cnpc.

6.3 Diluidores utilizados

Os diluidores Citrato-gema (2,37g de citrato de sódio; 0,80g de glicose e 2,5% de gema de ovo em 100mL de água destilada q.s.p.) e Tris-gema (3,634g de TRIS; 0,50g de frutose, 1,99g de ácido cítrico e 2,5% de gema de ovo em 100ml de água destilada q.s.p.) foram preparados segundo EVANS & MAXWELL (1991) e conservados a 5°C até sua utilização. O diluidor Água de Coco-gema (50mL de água de coco, 50mL solução citrato de sódio a 2,5%, 2,5% gema de ovo em 100mL de água destilada q.s.p) foi preparado segundo NUNES (1998) com modificações, visto que utilizou-se água de coco industrializada envasada em sistema UHT (SOCOCO S/A) e não *in natura*.

6.4 Colheitas e tratamento do sêmen

Os ejaculados foram colhidos por meio de vagina artificial com intervalo de uma semana entre colheita, sendo colhidos três animais por dia, duas vezes por semana. Ao final do período experimental foram realizadas 24 colheitas, perfazendo um total de 288 observações. Após a colheita, o volume de cada ejaculado foi mensurado individualmente e a concentração espermática determinada por espectrofotometria (Spectrophotometer 1105, Bell photonics). O sêmen de cada animal foi dividido em quatro alíquotas: as três primeiras foram diluídas a uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/ mL, nos diluidores Citrato-gema (CG), Tris-gema (TG) e Água de coco Industrializada-gema (ACI). Uma amostra de 300 μ L de cada uma dessas alíquotas foi imediatamente incubada em banho- maria a 38°C (T0) e avaliada por meio do TTR quanto ao vigor e motilidade aos 5, 60 e 120 minutos. O sêmen diluído foi conservado em tubos de ensaio imersos em água, na geladeira a 5°C por 2, 24 e 48 h e submetido ao TTR em cada tempo de conservação citado (T2, T24 e T48, respectivamente). Ao final de cada incubação foi calculada a Taxa de Degradação da Motilidade (TDM) por meio da seguinte fórmula:

$$\text{TDM} = \left[\frac{\text{Vigor 5 min} - \text{Vigor 120 min}}{\text{Vigor 5 min}} \right] \times 100$$

A quarta alíquota foi centrifugada (4°C/ 4000 g/20 min). Em seguida, o sobrenadante (PS) foi mensurado e acondicionado em tubos “ependorfs”, mantidos sob refrigeração a -18°C até que fossem realizadas as análises de frutose e atividade de fosfolipase A₂. Para a determinação dos níveis de frutose foram utilizados os kits ESPERMOTESTE da *In Vitro* Diagnóstico S/A[®]. De acordo com esses resultados os animais foram divididos em dois grupos: no grupo I os animais apresentaram média da concentração inicial de frutose igual a $787,98 \pm 52,56$ mg/dl e no grupo II esta média foi de $497,70 \pm 121,03$ mg/dl. A atividade da PLA₂ foi avaliada com a técnica de pHmetro utilizando a lecitina da gema de ovo como substrato (HAAS *et al.*, 1968; SIAS, 2005).

6.5 Morfologia Espermática

Aos 120 min de incubação em banho-maria e nos diferentes tempos de conservação e diluidores, foram confeccionados esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol (MEDEIROS, 2004) e 200 células foram observadas por meio de microscopia óptica de imersão (1000 X) para identificação de possíveis alterações da morfologia espermática (COLAS, 1980), provocadas pelos diluidores e nível de frutose.

6.6 Análise estatística

Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS[®]. O delineamento experimental empregado foi em bloco inteiramente casualizado. Os animais foram blocados de acordo com o nível de frutose presente no PS. Para os dados expressos em porcentagem procedeu-se primeiramente, a transformação angular com o objetivo de atender a condição de normalidade necessária a este tipo de análise. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para a avaliação dos efeitos do tipo de diluidor e dos níveis de frutose (bom > 740 mg/dL e ruim < 600 mg/dL) sobre os parâmetros seminais. Foram calculadas as médias dos parâmetros vigor, motilidade, TDM e morfologia espermática. As mesmas foram comparadas pelo teste de Tukey, com uma probabilidade de 5% de erro.

7. RESULTADOS

7.1 Efeito do tempo de conservação

Foi observada diminuição significativa ($P < 0,05$) do vigor a partir de 24h de conservação no diluidor ACI e às 48h nos diluidores CG e TG. A motilidade diminuiu significativamente ($P < 0,05$) com 48h de conservação no diluidor ACI e a partir de 24h nos diluidores CG e TG. No entanto a TDM não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tempos de conservação (tabela 1).

7.2 Efeito do diluidor

Foi observada diferença significativa entre os diluidores ACI e CG ($P < 0,05$) às 0, 2, 24 e 48h de conservação, de modo que os melhores índices de vigor foram encontrados no CG. O diluidor ACI diferiu significativamente do TG às 24 e 48h de conservação ($P < 0,05$) e as maiores médias foram observadas no TG (tabela 1). Não foram constatadas diferenças significativas entre estes diluidores nos demais tempos de conservação ($P > 0,05$). Também, não foi encontrada diferença entre os diluidores CG e TG ($P > 0,05$). No que se refere à motilidade, verificou-se que o diluidor ACI diferiu dos diluidores CG e TG ($P < 0,05$), e as melhores médias de motilidade foram observadas nestes diluidores com 24h de conservação, que por sua vez não diferiram entre si ($P > 0,05$). Nos demais tempos de conservação não foi encontrada diferença entre os diluidores ($P > 0,05$) (tabela 1).

Quanto à TDM, a 0 h de conservação foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os três diluidores e a menor TDM foi observada no CG, seguida pelo TG (tabela 1). Após 2, 24 e 48h de conservação, os diluidores CG e TG apresentaram resultados similares ($P > 0,05$), porém diferiram da ACI ($P < 0,05$) e apresentaram também, uma menor degradação.

7.3. Efeito de grupo (nível de frutose seminal)

Foi encontrada diferença do nível de frutose seminal entre os animais ($P < 0,0001$), de modo que foram divididos em dois grupos: grupo I, animais com alto nível de frutose ($787,98 \pm 52,56$ mg/ dL) no plasma seminal e grupo II, animais com baixo nível ($497,70 \pm 121,03$ mg/ dL), totalizando três animais em cada grupo. Os resultados do agrupamento estão expressos na tabela 2.

Uma diferença entre os grupos foi observada no diluidor ACI para os parâmetros motilidade e TDM, onde os melhores resultados foram encontrados no grupo I ($P < 0,05$). Nos diluidores CG e TG não foi observado efeito de grupo para o vigor, motilidade, TDM e AMT ($P > 0,05$).

No grupo I, não foi encontrada diferença entre os diluidores para o parâmetro de motilidade ($P > 0,05$). No que se refere ao vigor, este foi melhor nos diluidores CG e TG, que por sua vez não diferiram entre si ($P > 0,05$), entretanto o CG diferiu significativamente do ACI ($P < 0,05$). O mais baixo valor de vigor foi observado no ACI. No tocante à TDM, foi constatada diferença entre todos os diluidores ($P < 0,05$), de modo que a menor degradação foi observada no CG e a maior no ACI. No AMT foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$) entre o ACI e o CG, com um menor índice sendo encontrado no ACI.

No grupo II, uma diferença significativa foi encontrada entre ACI e CG ($P < 0,05$), com uma melhor motilidade ocorrendo no CG. O vigor diferiu significativamente entre os três diluidores ($P < 0,05$), o maior índice de vigor ocorreu no CG e o menor no ACI. Quanto a TDM e o AMT, não houve diferença entre estes parâmetros no CG e TG ($P > 0,05$), mas ambos diluidores diferiram do ACI, que por sua vez apresentou os resultados inferiores.

A atividade da fosfolipase A_2 foi determinada em ambos os grupos. No grupo I foi de $10,02 \pm 2,43$ U/ mL e no grupo II de $12,09 \pm 3,55$ U/ mL, não sendo constatada diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 1: Médias \pm desvio-padrão dos parâmetros vigor, motilidade e TDM do sêmen caprino diluído em três diferentes diluidores

Tempo de conservação (horas)	Diluidor ACI			Diluidor Citrato-gema			Diluidor TRIS-gema		
	Vigor	Motilidade	TDM	Vigor	Motilidade	TDM	Vigor	Motilidade	TDM
0	2,87 \pm 0,46 ^{Ab}	67,91 \pm 11,95 ^{Aa}	61,81 \pm 20,79 ^{Aa}	3,53 \pm 0,55 ^{Aa}	78,75 \pm 12,58 ^{Aa}	19,87 \pm 22,7 ^{Ac}	3,26 \pm 0,60 ^{Aab}	76,60 \pm 12,68 ^{Aa}	34,78 \pm 22,46 ^{Ab}
2	2,84 \pm 0,49 ^{Ab}	66,45 \pm 11,79 ^{Aa}	57,38 \pm 23,86 ^{Aa}	3,39 \pm 0,72 ^{ABa}	70,07 \pm 14,92 ^{ABa}	25,27 \pm 23,46 ^{Ab}	3,10 \pm 0,62 ^{ABab}	70,00 \pm 17,80 ^{ABa}	28,47 \pm 17,65 ^{Ab}
24	2,20 \pm 0,69 ^{Bb}	57,57 \pm 19,95 ^{ABb}	53,87 \pm 26,77 ^{Aa}	2,99 \pm 1,07 ^{BCa}	62,36 \pm 24,59 ^{BCa}	23,86 \pm 25,57 ^{Ab}	2,64 \pm 0,97 ^{BCa}	60,21 \pm 26,59 ^{BCa}	27,32 \pm 22,47 ^{Ab}
48	1,76 \pm 0,88 ^{Bb}	50,82 \pm 25,42 ^{Ba}	57,85 \pm 24,41 ^{Aa}	2,57 \pm 1,38 ^{Ca}	58,69 \pm 30,42 ^{Ca}	26,96 \pm 25,59 ^{Ab}	2,35 \pm 1,15 ^{Ca}	54,93 \pm 26,23 ^{Ca}	37,76 \pm 27,18 ^{Ab}

Letras Maiúsculas: comparação entre linhas / Letras minúsculas: Comparação entre colunas

Tabela 2: Médias \pm desvio-padrão dos parâmetros vigor, motilidade e TDM do sêmen caprino diluído em três diferentes diluidores após a divisão em grupos de animais com alto ou baixo nível de frutose seminal.

GRUPO	ACI				CG				TG			
	MOT	VIG	TDM	AMT	MOT	VIG	TDM	AMT	MOT	VIG	TDM	AMT
I	64,86 \pm	2,59 \pm	53,12 \pm	15,77 \pm	68,99 \pm	3,12 \pm	22,80 \pm	20,10 \pm	68,40 \pm	2,95 \pm 0,80 ^{Aab}	31,48 \pm	16,69 \pm 8,47 ^{Aab}
	15,42 ^{Aa}	0,62 ^{Ab}	19,95 ^{Ac}	10,67 ^{Ab}	22,90 ^{Aa}	1,00 ^{Aa}	22,98 ^{Aa}	13,23 ^{Aa}	20,15 ^{Aa}		17,48 ^{Ab}	
II	56,51 \pm	2,25 \pm	62,95 \pm	14,62 \pm	65,93 \pm	3,11 \pm	25,15 \pm	19,77 \pm	62,54 \pm	2,72 \pm 1,04 ^{Ab}	33,35 \pm	19,84 \pm
	21,77 ^{Bb}	0,91 ^{Ac}	26,71 ^{Bb}	7,58 ^{Ab}	22,95 ^{Aa}	1,09 ^{Aa}	25,07 ^{Aa}	11,02 ^{Aa}	25,25 ^{Aab}		27,48 ^{Aa}	

Letras Maiúsculas: comparação entre linhas / Letras minúsculas: Comparação entre colunas

AMT – Alterações morfológicas Totais

Grupo I: alto nível de frutose no PS, Grupo II: baixo nível de frutose no PS

8. DISCUSSÃO

8.1 Efeito do tempo de conservação

Neste experimento foi observado um efeito significativo do tempo de conservação sobre os parâmetros seminais avaliados, pois a refrigeração causou diminuição significativa na qualidade espermática, independente do diluidor utilizado. Resultados similares foram encontrados por MILCZEWSKI *et al.* (2000), no sêmen ovino, também utilizando diferentes diluidores, como o citrato-gema e o TRIS-gema. O efeito do tempo de conservação também foi observado por CAMPOS *et al.* (2004), em caprinos. Os estudos têm mostrado que à medida que a duração de incubação a 37°C prossegue, há o acúmulo de ácido láctico e o valor de pH tende a diminuir, acidificando o meio, levando conseqüentemente, a um declínio gradual na atividade metabólica. No estudo de SINGH *et al.* (1982), o tipo de diluidor não pareceu afetar significativamente o acúmulo de ácido láctico, mas sim o tempo de conservação. Estas mudanças no acúmulo de ácido láctico podem ser atribuídas à presença de flora microbiana no meio diluidor (SINGH *et al.*, 1982). Entretanto, MANN (1946) afirmou que o metabolismo espermático aumenta a conversão de frutose em ácido láctico, diminuindo assim o pH do meio. No presente estudo, o vigor e a motilidade foram melhores nos diluidores CG e TG do que na ACI. Estes resultados são similares aos encontrados por ROCA *et al.* (1997) com o diluidor tris-gema em caprinos Murciana–granadina. Apesar do diluidor, da taxa de diluição, da temperatura ou das condições de armazenamento, o espermatozóide se deteriora à medida que a duração do armazenamento aumenta (SALAMON & MAXWELL, 2000). Outros estudos têm mostrado que as propriedades lipídicas da membrana espermática são alteradas durante o resfriamento em condições aeróbicas, pois durante o processo de conservação há uma perda substancial de plasmalógeno dos espermatozóides (HARTREE & MANN, 1959).

As principais mudanças que ocorrem durante o armazenamento incluem redução na motilidade e integridade morfológica dos espermatozóides (SALAMON & MAXWELL, 2000), e acidificação do meio diluidor (MANN, 1946). Estudos têm sugerido necessidade da troca do meio diluidor a cada 24h como forma de melhorar a qualidade do sêmen diluído e prolongar a sobrevivência dos espermatozóides (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

8.2 Efeito do diluidor

Às 0, 2 e 48 horas de conservação não foi encontrada diferença entre os diluidores para a motilidade, todavia o efeito do diluidor pode ser visto sobre o vigor, a partir de 0 hora (fresco). Estes resultados sugerem que o vigor é muito sensível à manipulação do sêmen, podendo ser, portanto, o parâmetro que mais sofre influência das condições de diluição. A TDM apresentou seus menores índices de degradabilidade nos diluidores CG e TG. Os resultados encontrados demonstram que os diluidores que melhor preservaram as qualidades seminais avaliadas do sêmen caprino foram o CG e o TG. Em ovinos, alguns estudos, utilizando diluidor à base de citrato-gema, foi observado 55,22% de motilidade progressiva após 8h de armazenamento a 5°C, sendo superior ao TRIS-gema (42,17%). Após 4h de teste de termo-resistência (TTR), a motilidade dos espermatozóides diluídos em CG caiu para 50% enquanto que para os espermatozóides diluídos em TG, a motilidade chegou a 35% e em leite-UHT-gema, a 2,2% (MILCZEWSKI *et al.*, 2000). Os bons resultados encontrados com a conservação do sêmen caprino podem ser atribuídos à capacidade tamponante e à concentração de açúcar de ambos diluidores (MCDONALD, 1947; CUNHA & LOPES, 2000, VERSTEGEN *et al.*, 2005).

8.3. Efeito do grupo de animais (tabela 2)

Segundo CORTEEL (1981), a motilidade e o vigor são os parâmetros mais comumente utilizados para mensurar a qualidade do sêmen. A motilidade dos espermatozóides, segundo MIES FILHO (1986), é uma das principais características que devem ser levadas em conta no exame de sêmen para avaliação de sua capacidade fecundante. Visto que a motilidade é importante para ultrapassar a barreira cervical, após inseminação artificial por via transcervical, sendo portanto, um parâmetro importante para se alcançar boas taxas de concepção em ovelhas (COLAS, 1980).

A diferença entre os grupos de animais foi encontrada apenas no diluidor ACI para os parâmetros de motilidade e TDM. Nos demais diluidores não foi encontrado diferença. Na elaboração dos diluidores CG e TG entram na composição glicose (0,8%) e frutose (0,5%), respectivamente (EVANS & MAXWELL, 1990), e na água de coco industrializada (tetra pak) encontram-se altos níveis de carboidratos (2,5%). Os resultados encontrados sugerem que, na composição água de coco industrializada, o carboidrato presente pode não estar disponível ou pode não ser utilizado pelos espermatozóides. Além disso, não se tem perfeito controle dos

constituintes presentes na água de coco industrializada. Acredita-se que tenham ocorrido alterações das características originais da água de coco natural, inclusive, dos níveis de carboidrato. Segundo MANN (1946), a taxa de frutólise no sêmen conservado a 5°C após 1h é de 4%, todavia, após incubação a 30 – 37°C é de 96%, ou seja, o desaparecimento da frutose écorre em questão de horas. Segundo o mesmo autor, somente quando os espermatozóides depletam a própria reserva de açúcar do plasma seminal, o efeito benéfico da adição exógena de açúcar torna-se mais aparente (glicose, frutose ou manose). Desse modo, acredita-se que a depleção do açúcar em animais com baixo nível de frutose seja mais rápida, e os resultados encontrados sugerem que o diluidor ACI não supriu adequadamente os espermatozóides com energia para manter sua atividade metabólica, conforme observado no grupo II, onde no diluidor ACI foram encontrados os piores valores de motilidade e TDM. O mesmo não foi observado nos diluidores CG e TG que foram capazes de suprir as necessidades energéticas das células espermáticas durante a conservação a 5°C *in vitro*. No touro e no carneiro, a sobrevivência anaeróbica do espermatozóide é intimamente dependente da presença de frutose, pois ele torna-se imóvel se o sêmen for lavado para remoção do plasma seminal, e então privado da frutose. Mas esta sobrevivência pode ser prolongada pela adição de açúcar glicolizável (MANN & LUTWAK-MANN, 1948). Por outro lado, sob condições aeróbicas, os espermatozóides podem sobreviver temporariamente, mesmo após a remoção do plasma seminal. Todavia, no sêmen ovino lavado a capacidade de captação de oxigênio é de duração relativamente curta, mas que pode ser mantida por um certo período de tempo pela adição de certas substâncias, tais como, a frutose e o lactato. Estes achados levaram os autores a concluir que o metabolismo da frutose desempenha um importante papel não somente na ausência de oxigênio, mas também em condições aeróbicas (MANN & LUTWAK-MANN, 1948). No presente experimento, a concentração inicial de frutose no plasma seminal de caprinos é importante para que se obtenha uma boa qualidade seminal durante o resfriamento a 5°C.

Nos dois grupos, os melhores índices de motilidade, vigor e TDM foram encontrados nos diluidores CG e TG, confirmando a qualidade dos mesmos como conservantes do sêmen caprino no estado líquido, por suprirem as necessidades energéticas dos espermatozóides (MC DONALD, R., 1947; ROCA et al., 1997; MILCZEWSKI *et al.*, 2000). MANN (1946) afirmou que os espermatozóides utilizam frutose como fonte energética, mas que os mesmos são capazes de utilizar outros açúcares como a glicose e a manose, que podem agir como poupadores de frutose seminal. Isto explica porque tem sido possível, na prática, empregar com sucesso a glicose como nutriente no diluidor para armazenamento do sêmen utilizado na inseminação artificial (MANN, 1946). A habilidade do espermatozóide em utilizar igualmente

a frutose, a glicose ou manose deve-se ao fato de que estes três açúcares entram no ciclo da glicólise por meio da reação da hexoquinase com o ATP, seguido pela formação do monofosfato hexose até ácido láctico (MANN, 1945b; MANN, 1946; KING et al. 2006). Com respeito a este processo no sêmen íntegro, tem sido constatado que o mesmo ocorre no sêmen lavado onde há adição de açúcar artificial (MANN, 1945a; 1945b). Além disso, o progresso da frutólise no sêmen depende de vários fatores, tais como a concentração real de frutose no plasma seminal, a concentração espermática, pH e temperatura (MANN, 1946). Outros estudos têm demonstrado que os espermatozóides podem utilizar ácidos graxos como substrato para o metabolismo aeróbico, se privados da frutose (LOVERN *et al.*, 1957; HARTREE & MANN, 1959; HARTREE & MANN, 1961).

No que se refere à AMT, não houve diferença entre os grupos I e II, entretanto no grupo I, o menor índice de anormalidades foi encontrado no diluidor ACI. Porém, no grupo II e no mesmo diluidor, foi encontrada a maior proporção de alterações espermáticas. Alguns estudos têm indicado que a lesão primária associada com o choque térmico é na membrana plasmática, levando a consideráveis alterações morfológicas. Além disso, mudanças importantes na permeabilidade também resultam desta injúria. Todavia, algumas proteínas presentes no plasma seminal podem reparar os danos de membrana causados pelo choque térmico quando adsorvidas à membrana plasmática (BARRIOS *et al.*, 2000) e aumentar a resistência ao dano e preservar a integridade da membrana (BARRIOS *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que o resfriamento a 5°C estabilizou os microtúbulos dos espermatozóides humanos, mas o processo de resfriamento pode alterar algumas propriedades físicas da membrana plasmática, bem como outros aspectos da função espermática podem ser afetados pelo resfriamento (CHANTLER *et al.*, 2000). No presente experimento, acredita-se que no diluidor ACI, foi possível identificar diferenças morfológicas que não foram observadas nos outros diluidores (CG e TG), pois no grupo I foi encontrado o menor índice de AMT entre os diluidores e no grupo II o maior. Acredita-se que no plasma seminal do grupo I existam substâncias que protegeram a membrana espermática dos danos da conservação, e que possivelmente estejam correlacionadas com a concentração de frutose seminal. Todavia, mais estudos precisam ser realizados para comprovar esta hipótese.

No tocante à fosfolipase A₂, não foi encontrada diferença quanto à atividade da mesma entre os grupos experimentais, de modo que a fosfolipase A₂ não foi a responsável pela baixa qualidade do sêmen caprino no grupo II deste experimento. Entretanto, estudos mais profundos e com maior número de animais precisam ser realizados acerca da atividade da fosfolipase A₂, em caprinos criados em clima tropical, pois nenhuma correlação pode ser

estabelecida devido ao tamanho da amostra utilizada neste experimento. Alguns estudos conduzidos em clima temperado mostraram que houve variação estacional no comportamento reprodutivo, esta atividade foi de 15 U/mL (junho) e a 60 U/mL (setembro), quando se utilizou a mesma metodologia para determinação da atividade enzimática da FLA₂ (SIAS et al., 2005). Os mesmos autores observaram que outra enzima com atividade deletéria sobre os espermatozóides caprinos foi identificada, a GoPLRP2, cuja atividade mensurada nas amostras de plasma seminal sugere que a atividade da lipase e da fosfolipase origina-se da mesma enzima (SIAS et al., 2005). Vários estudos têm demonstrado que a FLA₂ presente no PS de caprinos exerce efeito deletério sobre a viabilidade dos espermatozóides conservados em meio à base de leite desnatado ou contendo gema de ovo constituindo um problema específico para conservação do sêmen caprino (LEBBOEUF et al., 2003; PELLICER-RUBIO et al., 1997).

9. CONCLUSÕES

Concluiu-se que, independente do diluidor utilizado, os parâmetros seminais tendem a cair conforme aumenta o tempo de conservação. Porém, verificaram-se melhores índices no sêmen diluído com CG e TG, quando comparados com ACI. O CG e o TG são diluidores preparados em laboratório para esta finalidade enquanto que a ACI sofre modificações em sua composição devido ao processo de industrialização.

A concentração inicial de frutose não interferiu na qualidade espermática quando os diluidores CG e TG foram utilizados, todavia, quando os níveis deste componente no plasma seminal foram superiores a 740 mg/dL ocorreu um aumento na sobrevivência dos espermatozoides conservados a 5°C, quando se utilizou ACI. Este diluidor apresenta os níveis energéticos inadequados, favorecendo o espermatozoide exposto a plasma seminal que apresenta níveis de frutose mais elevados, quando comparado àqueles expostos a PS com baixo nível de frutose. Desse modo, o diluidor água de coco industrializada (ACI) não deverá ser utilizado para conservação do sêmen caprino.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P. Cryopreservation of sperm. In: E. Knobil and J.D. Neill, Editors, **Encyclopedia of Reproduction**, Academic Press, Burlington, MA, pp. 773–783, 1999

AAMDAL, J., LINGSET, O., FOSSUM, K. Toxic effects of lysolecithin on sperm. **Nordisk Veterinær Medicin**. Copenhagen, 17, 633-634, 1965

ABDEL-RAHMAH, H. A.; EL-BELELY, M.S.; AL-QARAWI, A. A.; EL-MOUGY, S.A. The relation between semen quality and mineral composition of semen in various breeds. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v. 38, p. 45-49, 2000.

ARAÚJO, A.A.; CAMPOS, A.C.N. Fatores e critérios importantes para o sucesso da inseminação artificial ovina e caprina IN: CAMPOS, A.C.N (Coordenação Geral) **Do Campus para o Campo: Tecnologia para Produção de Ovinos e Caprinos**. Fortaleza: Gráfica Nacional, p. 267-286, 2005

AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrana integrity and motility of equine spermatozoa after criopreservation. **Theriogenology**, New York, v. 46, p. 791-797, 1996.

AZAWI, O. I., AL-DAHASH, S. Y. A. AND JUMA, F.T. Effects of different diluents on Shami goat semen. **Small Ruminant Research**. Lennoxville, 9: 347-352, 1993.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**, Augusta, v.63, p. 1531-1537. 2000.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; AND JOSÉ A. CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 26, n. 4, p. 539 – 549, 2005.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 68, p. 181-190, 2001.

BITTMAR, A.; KOSINIAK, K. The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing. **Archivum Veterinarium Polonicum**, Wroclaw Norwida, v. 32, p. 17-28, 1992.

CABRERA, F.; GONZÁLEZ, F.; BATISTA, M.; CALERO, P.; MEDRANO A.; GRACIA, A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). **Reproduction in Domestic Animals**. Berlim, v. 40, p. 191-195, 2005.

CALVETE, J. J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlim, v. 29, p. 411-426, 1994

CAMPOS, A. C. N. Morfometria do trato genital masculino: influência do plasma seminal obtido em época seca ou chuvosa sobre os espermatozoides de caprinos. Fortaleza: UECE, Faculdade de Veterinária, 2003. 85p. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2003.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U; PINHEIRO, J.H.T.; FERREIRA, M.A.L.; CRUZ, J.F. Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 27, n. 4, p. 620-624, 2003b.

CAMPOS, A. C. N., NUNES, J. F., MONTEIRO, A. W. U., FIGUEIREDO, E. L., PINHEIRO, J. H. T., FERREIRA, M. A. L., ARAÚJO, A. A. Viabilidade do sêmen caprino lavado e não lavado diluído em água de coco e armazenado a 4 °C . **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói v.11, p.178 - 182, 2004.

CARDOZO, J.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO T. AND CEBRIÁN-PÉREZ, J. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, **Theriogenology** v. 66, pp. 841–850, 2006

CHACUR, M. Efeito nociceptivo induzido por fosfolipases a2 (variantes lys49 e asp49) isoladas do veneno de serpentes bothrops asper: caracterização dos mecanismos centrais e

determinantes moleculares. 2004. 155f. **Tese (Doutorado)**; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2004.

CHANTLER, E.; ABRAHAM-PESKIR, J. V.; LITTLE, S.; MCCANN, C.; MEDENWALDT, R. Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. **Cryobiology**, York, v. 41, p. 125 – 134, 2000.

CHAUAN, M. S. AND ANAND, S.R. Effects of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. **Theriogenology**, New York v. 34; p. 1003-1013, 1990.

CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.-C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**. FAO Animal Production and Health Paper, Rome, p.222, 1991.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le belier Ile-de-France I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, Jouy-en-Josas, v. 20, n. 6, p.1789-1799, 1980.

COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. **East School Agriculture Science University of Norththngans**, 1983, Norththngans, Anais 1983. p. 453-465.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal. Effect du glucose. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, Paris, v. 14, n. 4B, p. 741 –745, 1974.

CORTEEL, J. M. Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés *in vitro*. **Reproduction Nutrition Development**, Jouy-en-Josas, v. 20, n. 4, p. 1111-1123, 1980.

CORTEEL, J.-M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. Nouzilly – France: **INRA**, 28p. 1981.

CORTEEL, J. M. Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. **In: Procedures of 5th International Conference on Goats, Vol. II**, New Delphi, India, pp. 290-297, 1992

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Estudo do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores a base de leite e glicina-gema. **Revista de Educação Continuada CRMV/SP**, São Paulo v.3, p.37-42, 2000.

CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, York, v. 31, p. 39 – 46, 1994

DEKA, B. C., RAO, A. R. Motility of buck spermatozoa during preservation at 5°C with and without seminal plasma. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 63, 169-170, 1986

DEN DASS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 28, p. 87 – 94, 1992.

DE PAUW, I.M.C.; VAN SOOM, A.; MINTIENS, K.; VERBERCKMOES, S. KRUIF, A. In vitro of bovine spermatozoa stored at room temperature under Epididymal conditions. **Theriogenology**, New York, v. 59, p. 1093 – 1107, 2003a.

DHAMI, A. J. G.; KODAGALI, S. B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen of surti buffalo bulls. **Indian Journal Animal Science**, Chennai v. 57, n. 12, p. 1283-1286, 1987.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. Comparative assessment of certain biochemical and mineral constituents of seminal plasma and their interrelationships in ox and buffalo bulls. **UAR**. v. 14, n. 2, p. 98-100, 1993.

DOTT, H. M.; HARRISON, R. A. P.; FOSTER, G. C. A. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 55, p. 113-124, 1979.

DUA, L.S.; CHANDRA, M. The identification and isolation of plant growth regulating substances from the liquid endosperm of *Cocos nucifera*. **Cocconut Research Development**, p.219-227, 1993.

EATON, O.N.; SIMMONS, V.L. A semen study of goats. **American Journal of Veterinary Research**, Michigan, v. 13, p. 537 – 544, 1952.

EIMAN, M.; ABOGLA, E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**. New York V.62, p. 1160-1172, 2004

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon`s Artificial Insemination of Sheep and Goats., **Butterworths**, Sydney 194 p., 1987

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 4. Semen y sus características. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, p.25. 1990.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. **Cryobiology**, York, v.23, n.6, p. 518-524, 1986.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. SDS pages characterization of the protein in equine seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v. 46, p. 579-591, 1996.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, New York, v. 59, p. 1241-1255, 2003.

GONZALES, C. I. M.; NEVES, J. P.; SILVA, C. A M. Determinação do sódio, potássio, cálcio e magnésio no PS ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a +37°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 8, n. 3, p. 174-178, 1984.

HAAS, G.H. DE; POSTEMA, N.M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L.M.; Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 159, p. 103-117, 1968.

HAYAISHI, O. Phospholipase A. **Methods in enzymology**. Cap.110, Enzymes of lipid metabolism. v.1, p. 660-672, 1995.

HARTREE, E.F.; MANN, T. Plasmagen in ram semen, and its role in sperm metabolism. **Biochemical Journal**. Auckland v. 71, n. 3, p. 423 – 434, 1959.

HARTREE, E.F.; MANN, T. phospholipids in ram semen: metabolism of plasmalogen and fatty acids. **Biochemical Journal**. Auckland v. 80, n. 3, p. 464 – 476, 1961.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. S.; KAVANAUGH, J. F.; ORIEL JR., L. C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Augusta, v. 52, p. 390-397, 1995.

HENKEL, R.; BITTNER, J.; WEBER, R.; HUTHER, F.; MISKA, W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. **Fertility and Sterility**, USA, v. 71, n. 6, p. 1138 – 1143, 1999.

HIROE, K.; TOMISUKA, Y. W.; MASSKI, J. Biochemical studies on the semen of domestic animals: On the chemical composition of seminal plasma of goats. **Japanese Journal Animal Reproduction**, Tokio, v. 6, n. 1, p. 28-30, 1960.

IBARRA, M. C. B.; NAVARIDAS, A. S. Variaciones estacionales de los niveles de frutosa, ácido cítrico y proteínas totales en ejaculados de moruecos de raza Manchega. **Investigacion Agrária Produccion y Sanidad Animales**, Madrid v. 7, n. 3, p. 235-240, 1992.

IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg-yolk coagulating factors in goat semen: II Properties of the coagulating factors and influential conditions for coagulation. In: **Silver Jubilee Laboratory Animals**, Husbandry: Kyoto University, PROCEEDINGS, p. 97-104, 1961.

IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg coagulating enzyme in goat semen. **Japanese Journal of Zootechny Science**, Tokio v. 10, p. 57 – 62, 1964.

ISLAM, R.; AHMED, K.; DEKA, B.C. Effect of holding and washing on the quality of goat semen. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v. 66, p. 51–57, 2006.

KAYA, A.; AKSON, M.; TEKELI, T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic of seminal plasma in ram. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v. 44, p. 153 – 158, 2002.

KING, S.S.; SPEISER, S.A.; JONES, K. L.; APGAR, G.A.; WESSELS, S.E. Equine spermatozoal motility and fertility associated with the incorporation of d-(+)-mannose into semen extender. **Theriogenology**, New York, v.65, n. 6, p. 1171-1179, 2006.

KUNZE, H.; NAHAS, N.; WURL, M. Phospholipases in human seminal plasma, **Biochimica et Biophysica Acta**. 348 (1), p.35-44, 1974.

KVIST, U. Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. **Acta Physiology Scandinavan**, Stockholm, v. 109, p. 79-84, 1980.

La FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES, J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**. New York, v. 57, p. 1035-1048, 2002.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. **INRA. Prod. Anim.**, v.16, n.2, p. 91-99, 2003.

LEWIS-JONES, D.L.; AIRD, I.A.; BILJAN, M.M.; KINSLAND, C. R. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. **Human Reproduction**. Oxford v. 11, n. 11, p. 2465-2467, 1996.

LIMA, F.R.G. Performance reprodutiva de cabras nativas criadas no sertão do Ceará, submetidas diferentes tratamentos de sincronização do estro e da ovulação. Fortaleza – Ce, 48p., 1996. Dissertação (mestrado em produção e reprodução de pequenos ruminantes). Universidade Estadual do Ceará – UECE.

LOVERN, A.; OLLEY, J.; HARTREE, F.; MANN, T. The lipids of ram Spermatozoa. **Biochemistry Journal**. Auckland, v. 67, n. 4, p. 630 – 643, 1957.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. 1995. Inseminação Artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 19, p. 61-72.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 1. General aspects. Occurrence and distribution of cytochrome, certain and coenzymes. **Biochemistry Journal**. Auckland, v. 39, n. 5, p. 451 – 458, 1945a.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 2. glycolysis in spermatozoa. **Biochemistry Journal**. Auckland, v. 39, n. 5, p. 458 – 465, 1945b.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 3. fructose as a normal constituent of seminal plasma site of formation and function of fructose in semen. **Biochemistry Journal**. Auckland, v. 40, n. 4, p. 481 – 491, 1946.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. 4. Studies on the metabolism of semen: aerobic and anaerobic utilization of fructose by spermatozoa and seminal vesicles. **Biochemistry Journal**. Auckland, v. 43, n. 2, p. 266 – 270, 1948.

MANN, T.; LUTWAK- MANN, C. Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, **Biochemistry and Investigative Andrology**. Berlin: Springer-Verlag, 1981.

MANN, T.; WHITE, I. G. Glycerol metabolism by spermatozoa. **Biochemistry Journal**. Auckland, v. 65, n. 2, p. 634 – 639, 1957.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 37, p. 179-188, 1974.

MARQUES, A.L.V. Água de coco. **Informativo Soccego**, A2, n. 92, 1982.

MARKOFSKY, S.B. Nitro Compounds, Aliphatic **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2002.

MARTI, E. MARA, L. MARTI, J.I. MUIÑO-BLANCO, T. CEBRIÁN-PÉREZ J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 9, p. 1446-1454, 2007.

MARTIN, I.C.A. Milk and synthetic diluents for ram semen. In: **International congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination**, 2, 1968, Paris. Proceeding. Paris, 1968, p.1619-1622.

MATHEW, J., RAJA, C. K. S. U.; NAIR, K. P. 1982. Preservation of buck semen in TRIS yolk diluent. In: **International Conference on goats**. Proceedings. Tuckson: Dairy Goats J. Pub. Co., p506.

MAXWEEL, W. M. C.; SALAMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. **Reproduction Fertility Development**. Collingwood, v. 5, p. 613 – 638, 1993.

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

MCDONALD, R. Semen dilutors and dilutions. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Gardenville, v. 11, n. 10, p. 305-306, 1947.

MEDEIROS, A. A. Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para a avaliação da morfologia do espermatozóide ovino. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 49p. **Dissertação de Mestrado**. 2004.

MEMON, M. A., BRETZLAFF, K. N. AND OTT, R. S., Effects of washing on motility and acrossome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 2, p. 52-56, 1985.

MIES FILHO, A - **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 5ª ed. Ed. Sulina, 1986.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba v.5, p.29-33, 2000.

MISRA, D. N., DEKA, B. C., BORGHAIN, B. N. Effect of holding time on quality of goat semen during preservation at + 5°C. **Indian Journal of Animal Reproduction** Chennai, v. 14, n. 1, p. 49-50, 1993.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective affect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 1695 – 1706, 2002.

MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; HERMANN, A. Transbilayer motion of spin-labelled phospholipids in the plasma membrane of epididymal and ejaculated ram spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, Colcherter, v. 111, p. 81-89, 1997.

NUNES, J. F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des espermatozoïdes de bouc. Paris. Université Paris VI, **Tese** (Ciências da Vida). 45p. 1982.

NUNES, J.F. A inseminação artificial em caprinos no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 12, p. 85-91, 1988.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. **1º Simpósio de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos**, Anais. Fortaleza, p. 53-63, 1995.

OLLERO, M.; GARCÍA-LOPÉZ, N.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ. J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phases system. **Reproduction Fertility Deveolpment**, Collingwood, v. 9, p. 81-390, 1997.

O´SHEA, T; VOGLMAYR, J.K. Metabolism of glucose, lactate, and acetate by testicular and ejaculated spermatozoa of the ram. **Biology of Reproduction**. Augusta v. 2, n. 2, p. 326 – 332, 1970.

PELLICER-RUBIO M. T.; MAGALLON T.; COMBARNOUS Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kDa glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biol. Reprod.**; v. 57: 1023-31, 1997.

PEREZ LLANO, B.; MATEOS REX, E. Efecto del tipo de crioprotetor externo e del porcentaje de glicerol sobre la calidad *in vitro* del semen congelado de macho cabrio. **Producción y Sanidad Animal**. V. 10, nº 3, p. 211-221, 1995.

PETRUZZI, V.; TARANTINI, S.; ROYCHOUDHURY, P. N. Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin v. 23, n. 7, p. 556-561, 1976

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Níveis de Cálcio, Fósforo, Magnésio e pH do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 33, Fortaleza, Anais ... Fortaleza, p. 419-421, 1996a.

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros bioquímicos do PS de 3 tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 33, Fortaleza, Anais Fortaleza, p. 416-418. 1996b.

POLAKOSKI, K. L.; KOPTA, M. Seminal plasma. In: **ZANEVELD, L. J. & CHATTERTON, R. T.** Biochemistry of mammalian reproduction, John Wiley, New York, p. 89-117, 1982.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**. Lennoxville, V. 63, n° 3, p. 215-225, 2005.

RITAR, A. J., SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v. 35, p. 305-312, 1982.

RITAR, A. J., SALAMON, S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v. 4, p. 29-37, 1991.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VÁSQUEZ, J. M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciana-Granadina goats in the Mediterranean. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 29, p. 255-263, 1992.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VÁSQUEZ, J. M. Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciana-Granadina goats. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v. 10, p. 219-226, 1993.

ROCA, J. CARRIZOSA, J. A., CAMPOS, I., LAFUENTE, A., VAZQUEZ, J. M., MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and storage at 5°C. **Small Ruminant Research**, Lennoxville, v. 25, p. 147-153, 1997.

RODGER, J. C. Seminal plasma, an unnecessary evil? **Theriogenology**, New York, v. 3, n. 6, p. 237-247, 1975.

ROLDAN, E. R. S. Role of phospholipases during sperm acrossomal exocytosis. **Frontiers in Biocience**, Madrid, v. 3, p. 1109-1119, 1998.

RONKKO, S., RASANEN, M. Studies on phospholipase A2 in human seminal plasma. **International Journal of Biochemistry**. Oxford v. 24, p. 987-992, 1992.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. **Nature**, v. 159, p. 318 – 319, 1957.

SAHNI, K. L. Practical aspect of artificial insemination of goats in India. In: **International Conference on Goat**, 4, Proceedings. Brasília: EMBRAPA – DTC. 549 – 569. 1987.

SAHNI, K. L.; ROY, A. A note on the application of cold shock test for determining the resistance (quality) of sheep and goat spermatozoa. **Indian Journal of Animal Science**, v. 42, p. 198-201, 1972.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, n. 1-2, p. 3b1-36, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 77 – 111, 2000.

SALLES, M. G. F. Água de coco (*Cocos nucifera* L.) "in natura" e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor de sêmen caprino. Porto Alegre, 1989. **Tese** (Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, 1989).

SANCHEZ – PARTIDA, L. C.; SETCHELL, B. P.; MAXWELL, W. M. C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram. **Reproduction Fertility Development**, Collingwood, v. 9, p. 689–696, 1997.

SIAS, B.; FERRATO, F.; PELLICER-RUBIO, M.T.; FORGERIT, Y.; GUILLOUET, P.; LEBOEUF, B.; CARRIÈRE, F. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. **Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipids Metabolism**. Saskatoon, v. 1686, n. 3, p. 169-180, 2005.

SINGH, M. P.; SINHA, S. N.; SINGH, B. Studies on preservation of buck semen. **Indian Veterinary Medicine Journal**, v. 6, p. 123 – 130, 1982.

SINGH, L. P.; PENBEY, L. N. Relationship between seminal attributes and peripheral testosterone level in Desi bucks. **Indian Journal Animal Research**, v. 65, n. 10, p. 1112-1124, 1995.

SKANDHAN, K. P. Zinc in normal human seminal plasma. **Andrologia**, Giessen, v. 13, n. 4, p. 436-351, 1981.

SOUBEYRAND, S.; KHADIR, A.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Purification of a novel phospholipase A₂ from bovine seminal plasma. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 1, p. 222-227, 1997.

STREZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIAK, A. Purification and partial characterization of a 5,700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 29, p. 5-52, 1992.

THAKKER, J.K.; EAST, J.; SEYLER, D.; FRANSON, R.C. Surface active PLA₂ in mouse spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipids Metabolism**. Saskatoon, n. 754, v. 1, p. 44–50, 1983.

TULI, R.K.; HOLTS, W. Effects of season on the freezability of boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 1359 – 1363, 1995.

UPRETI, G. C.; PAYNE, S. R.; DUGANZICH, D. M; OLIVER, J. E.; SMITH, J. F. Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 41, p. 27 – 36, 1996.

UPRETI G. C.; HALL E. L.; KOPPENS D.; OLIVIER J. E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam n.56, p.107-21, 1999

VERSTEGEN, J.P; ONCLIN, K. AND IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, New York, Volume 64, Issue 3, August 2005, Pages 720-733.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 23 – 53, 2000.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. **Journal Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

WATSON, P.F; MARTIN, I.C. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. **Australian Journal Biology Science**, Melbourne v. 28, n. 2, p. 145-152, 1975.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60 – 61, p. 349 – 355, 2000.