



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

**EFEITO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL
DE CAPRINOS SOBRE OS ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO E EJACULADO RESFRIADOS A 5° C**

JEANE FERREIRA PEREIRA ROCHA

FORTALEZA – CEARÁ

2012

JEANE FERREIRA PEREIRA ROCHA

**EFEITO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL
DE CAPRINOS SOBRE OS ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO E EJACULADO RESFRIADOS A 5° C**

Dissertação submetida à Coordenação da Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia
Nascimento Campos**

FORTALEZA – CEARÁ

Agosto de 2012

JEANE FERREIRA PEREIRA ROCHA

**EFEITO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL
DE CAPRINOS SOBRE OS ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO E EJACULADO RESFRIADOS A 5° C**

Dissertação submetida à Coordenação da Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Aprovada em 23 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos
(ORIENTADORA)

Prof^a. Dra. Ana Gláudia Vasconcelos Catunda
(CO-ORIENTADORA/FAFIDAM)

Prof^a Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha
(AVALIADORA - UFC)

Dr. Maurício Fraga van Tilburg
(AVALIADOR -UFC)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

R571e Rocha, Jeane Ferreira Pereira.

Efeito da composição bioquímica do plasma seminal de caprinos sobre os espermatozoides da cauda do epidídimo e ejaculado resfriados a 5° c / Jeane Ferreira Pereira Rocha. – 2012.
61 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Zootecnia, Mestrado em Zootecnia, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos.

Coorientação: Prof^ª. Dra. Ana Gláudia Vasconcelos Catunda.

1. Plasma seminal – caprinos - conservação. 2. Tris-gema. 3. Citrato-gema. I. Título.

CDD 636.08

*DEDICO este trabalho aos meus pais **Francisco** e **Marfisa** pelo amor incondicional dedicado a mim. Ao meu irmão **Jerlan**, meu marido **Jorge** e meu filho **George**. A vocês todo meu amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor e paciência que me foram dadas para enfrentar os momentos mais difíceis, superar provações e continuar seguindo meu caminho rumo a conclusão desde curso e por fazer com que tudo acontecesse no momento certo, por ter me dado a oportunidade juntamente com sabedoria e coragem para aproveitá-la;

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu pai Francisco das Chagas e principalmente à minha querida mãe Marfisa, por todo amor, incentivo, dedicação, oração, compreensão e apoio ofertados a mim;

Ao meu irmão Jerlan, pelo o incentivo e por substituir a minha ausência junto aos meus pais durante os momentos mais difíceis desta jornada;

Ao meu marido Jorge que mesmo chegando na minha vida quase no fim dessa jornada, conseguiu mudá-la completamente e principalmente ao presente nos dado por Deus, nosso filho Jeorge, que me mostrou o verdadeiro sentido da vida e que me deu forças para lutar por muito mais;

À Professora Ana Cláudia Nascimento Campos, pela orientação, amizade, paciência, confiança, conselhos e ensinamentos constantes;

Aos alunos de graduação e pós-graduação que ajudaram na condução dos trabalhos dentre eles: Gabriel, Marco Antônio, Bruno, Ítalo, Mariana, Saskia, Wellington, Andrea, Emanuel, Airton, Fabiano, Wandéórgenes, Pedro e todos os outros que fazem ou fizeram parte dessa família chamada LERA. Meu muito obrigado;

À minhas amigas-irmãs Ana Gláudia, Gyselle, Katiane e Fátima Révia, pelo apoio, conselhos, ensinamentos, compreensão, companheirismo, cumplicidade, e pelos momentos de descontração que fizeram os meus dias ficarem mais agradáveis. Aos meus amigos Izaías e Rafael, pela amizade, carinho, apoio, conselhos e principalmente pela torcida;

Agradeço também a todos aqueles que de uma forma ou de outra colocaram em meu caminho obstáculos nesta tortuosa, perigosa, porém emocionante estrada rumo ao mestrado. Todas as dificuldades enfrentadas por mim ensinou-me a aprender os ensinamentos do maior de todos os professores: “Jesus Cristo”.

MUITO OBRIGADA

*“Celebrai com júbilo ao **Senhor**, todas as terras. Servi ao **Senhor** com alegria; e entrai diante dele com canto. Sabei que o **Senhor** é Deus; foi ele que nos fez, e não nós a nós mesmos; somos povo seu e ovelhas do seu pasto. Entrai pelas portas dele com gratidão, e em seus átrios com louvor, louvai-o, e bendizei o seu nome. Porque o **Senhor** é bom, e eterna a sua misericórdia; e a sua verdade dura de geração em geração.*

SALMO 100

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Plasma seminal e sua ação sobre os espermatozoides durante a ejaculação.....	2
2.1.1. Frutose no plasma seminal.....	3
2.1.2. Fosfolipase A ₂ do plasma seminal.....	5
2.1.3. As proteínas do plasma seminal.....	6
2.1.4. Principais eletrólitos do plasma seminal.....	7
2.2. Espermatozoides epididimários.....	10
2.3. Diluidores.....	11
2.3.1. Tris-gema.....	12
2.3.2. Citrato-gema.....	13
2.3.3. Gema de ovo.....	13
3. OBJETIVO.....	15
3.1. Geral	15
3.2. Específico	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Local do experimento.....	16
4.2. Animais experimentais.....	16
4.3. Coleta do plasma seminal.....	16
4.4. Preparo dos diluidores.....	17
4.5. Coleta e processamento do sêmen.....	17
4.6. Avaliação bioquímica do plasma seminal.....	19
4.7. Castração e obtenção dos espermatozoides da cauda do epidídimo.....	19
4.8. Morfologia espermática.....	20
4.9. Separação dos grupos.....	20
4.10. Análise Estatística	21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Avaliação dos parâmetros seminais de espermatozoides ejaculados de caprinos....	22
5.2. Avaliação dos parâmetros seminais do ejaculado em função das concentrações de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio, e a atividade da FLA ₂ no plasma seminal...	23
5.3. Resultados sobre os parâmetros seminais de espermatozoides da cauda do epidídimo.....	27
5.4. Comparação entre os parâmetros seminais dos espermatozoide da cauda do epidídimo e do ejaculado.....	32
6.CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da composição bioquímica do plasma seminal nos espermatozoides da cauda do epidídimo e do ejaculado caprino, diluídos em citrato-gema (CG) e tris-gema (TG). Os ejaculados de 8 animais foram coletados pela manhã e o sêmen fresco foi dividido de forma a se obter 4 tratamentos: CG (lavado e não lavado), TG (lavado e não lavado). No mesmo dia à tarde, os animais foram castrados para obtenção dos espermatozoides da cauda do epidídimo, dos quais foram retiradas quatro alíquotas de 100 µL. Em duas delas foi adicionada 120 µL de plasma seminal autólogo, constituindo assim outros 4 tratamentos: CG (espermatozoide da cauda do epidídimo com e sem plasma seminal) e TG (espermatozoide da cauda do epidídimo com e sem plasma seminal). O plasma seminal foi avaliado quanto à composição bioquímica. As amostras dos 8 tratamentos foram analisadas quanto ao vigor, motilidade e morfologia espermática, a 0 h (fresco) e após 2 e 24 h conservação a 5°C. Os dados foram analisados pelo SAS[®]. No agrupamento pela concentração de frutose e cloretos foi observado um efeito significativo ($p < 0,05$) independente do diluidor e tratamento, para os espermatozoides ejaculados com defeitos menores e normais. A partir da concentração de potássio foi revelado que apenas o vigor sofreu efeito de grupo ($p < 0,05$). Nos espermatozoides da cauda do epidídimo, a frutose constituiu efeito significativo para interação entre grupo, tratamento e tempo sobre a motilidade, já para o vigor foi observado um efeito significativo da interação entre tratamento e tempo e efeito de grupo, para as concentrações de frutose e potássio respectivamente. Para a concentração de cloretos, foi constatado um efeito significativo na interação entre o grupo e o tratamento sobre a ocorrência dos defeitos maiores, ($p < 0,05$). Após a conservação por 24 horas, os melhores valores foram observados nos espermatozoides da cauda do epidídimo sem plasma seminal, no entanto na presença de plasma seminal, os espermatozoides do ejaculado suportaram melhor a conservação. A adição de plasma seminal reduziu os parâmetros seminais dos espermatozoides da cauda do epidídimo. A composição bioquímica do plasma seminal de caprinos criados no nordeste do Brasil interfere sobre a qualidade do sêmen resfriado.

Palavras-chaves: caprinos, composição bioquímica, conservação, ejaculado, epidídimo, espermatozoides, plasma seminal.

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the effect of biochemical composition of seminal plasma (SP) on spermatozoa from caudal epididymis and ejaculated goat sperm, diluted in egg yolk-citrate (EYC) and egg yolk-tris (EYT). The ejaculates of 8 animals were collected in the morning and fresh semen was divided in order to obtain 4 treatments: EYC (washed and no washed), EYT (washed and no washed). On the same day, in the afternoon, the animals were orchidectomized to obtain spermatozoa from caudal epididymis, of which four aliquots of 100 μ L were removed. Two of them were added 120 μ L of autologous seminal plasma, consisted in other 4 treatments: EYC (spermatozoa from caudal epididymis with and without seminal plasma) e EYT (spermatozoa from caudal epididymis with and without seminal plasma). The seminal plasma was evaluated for biochemical composition. Samples of 8 treatments were analyzed for vigor, motility and sperm morphology, at 0 hour (fresh) and after 2 and 24 hours in storage at 5°C. Data were analyzed with the statistic software SAS[®]. The following results were found. In grouping by the concentration of fructose and chlorides was observed a significant effect ($p < 0.05$) independent of diluent and treatment, for ejaculated spermatozoa with minor defects and normal. From the potassium concentration was showed that only the vigor suffered group effect ($p < 0.05$). In the spermatozoa from caudal epididymis, fructose was a significant effect for group interaction, treatment and time on motility, for the vigor there was a significant interaction effect between treatment and time and group effect, in the fructose and potassium concentrations, respectively. For the chloride concentration was observed a significant interaction between group and treatment on the occurrence of major defects, ($p < 0.05$). After 24 hours of storage, the best values were observed in sperm without seminal plasma from caudal epididymis, however in the presence of seminal plasma, sperm from the ejaculate withstood better conservation ($p < 0.05$). The addition of seminal plasma reduced seminal parameters of the sperm from caudal epididymis. The biochemical composition of seminal plasma of goats raised in northeastern Brazil interferes directly on the quality of cooled semen.

Keywords: goats, biochemical composition, conservation, ejaculate, epididymis, sperm, seminal plasma.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Pág.

QUADRO 1 – Composição do diluidor Tris-gema (TG) para o sêmen caprino.....	13
QUADRO 2 – Composição do diluidor Citrato-gema (CG) para o sêmen caprino.....	13
QUADRO 3 - Média dos grupos de acordo com a concentração bioquímica.....	20
TABELA 1 – Médias e desvio-padrão de motilidade, vigor, espermatozoides normais e com defeitos menores (DEME) em diferentes tempos de conservação.....	23
TABELA 2 - Médias e desvio-padrão dos espermatozoides com defeitos maiores (DEMA) do sêmen lavado e não lavado em diferentes tempos de conservação.....	23
TABELA 3 – Médias e desvio-padrão dos espermatozoides com defeitos menores (DEME) nos grupos A e B nos diferentes tempos de conservação.....	24
TABELA 4 – Médias e desvio-padrão de motilidade, vigor e defeitos maiores de animais divididos em dois grupos de acordo com a concentração de frutose no plasma seminal.....	24
TABELA 5 – Médias e desvio-padrão de motilidade e vigor do sêmen de animais divididos em dois grupos de acordo com a concentração de cloretos no plasma seminal...	26
TABELA 6 - Médias e desvio-padrão do número de espermatozoides normais e com DEME no sêmen de animais divididos em dois grupos de acordo com a concentração de cloretos no plasma seminal, em diferentes tempos de conservação.....	26
TABELA 7 - Médias e desvio-padrão de motilidade e vigor de espermatozoides epididimários tratados com e sem adição de plasma seminal em diferentes tempos de conservação.....	28
TABELA 8 - Médias e desvio-padrão de motilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo nos grupos A1 e A2 conservados em diferentes tempos com ou sem adição plasma seminal.....	29
TABELA 9 - Médias e desvio-padrão do vigor de espermatozoides da cauda do epidídimo tratados com e sem plasma seminal em diferentes tempos de conservação.....	30

TABELA 10 - Médias e desvio-padrão do vigor de espermatozoide da cauda do epidídimo dos grupos A1 e A2 tratados com e sem plasma seminal.....	30
TABELA 11 - Médias e desvio-padrão de espermatozoide da cauda do epidídimo com DEMA dos grupos D1 e D2 submetidos ao tratamento com e sem plasma seminal.....	31
TABELA 12 - Médias e desvio-padrão da motilidade dos espermatozoides epididimários e ejaculados de caprinos com e sem plasma e lavado e não lavado conservados a 5 °C por 0, 2 e 24 horas.....	33
TABELA 13 - Médias e desvio-padrão do vigor dos espermatozoides epididimários e ejaculados de caprinos com e sem plasma e lavado e não lavado conservados a 5 °C por 0, 2 e 24 horas.....	33

1. INTRODUÇÃO

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

O Plasma Seminal dos mamíferos é um complexo fluido, originado dos testículos, epidídimos e múltiplas glândulas do aparelho reprodutivo do macho e conhecido por inibir ou estimular a função espermática e a fertilidade (CALVETE et al., 1994; MULLER et al., 1997). Outros estudos demonstraram que o plasma seminal promove a ativação metabólica das células espermáticas, disponibilizando nutrientes para o seu metabolismo e retardando o processo de capacitação, para que este ocorra no aparelho genital da fêmea (EVANS e MAXWELL, 1990; MÜLLER et al., 1997).

O plasma seminal tem sido objeto de intensas investigações bioquímicas, seja por sua capacidade de influenciar a fertilidade potencial dos espermatozoides ou pelo fato de que, alguns de seus constituintes 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 nesta área, os conhecimentos sobre a função do plasma seminal na espécie caprina ainda são escassos. O tratamento *in vitro* do sêmen ocasiona variações no metabolismo e/ou sobrevivência dos espermatozoides e a inexistência de mecanismos de eliminação das células espermáticas mortas submete os gametas vivos a uma convivência com os produtos de sua decomposição, o que prejudica a qualidade do sêmen (CORTEEL, 1980).

Diante do exposto, este trabalho objetivou verificar o efeito da composição bioquímica do plasma seminal de reprodutores caprinos sobre as características morfológicas e funcionais de espermatozoides epididimários, adicionados de plasma seminal e ejaculados lavados, diluídos em diferentes diluidores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plasma seminal e sua ação sobre os espermatozoides durante a ejaculação

O plasma seminal contém uma variedade de constituintes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos dentro do mecanismo de regulação da função do espermatozoide e embora as funções dos componentes seminais no controle da motilidade espermática, ainda não estão bem elucidadas, o contato com o fluido seminal desencadeia eventos preparatórios nos espermatozoides 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).

Muitos estudos constataram diferenças na qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes entre as estações do ano em clima temperado (EATON e SIMMONS, 1952; COLAS, 1980; NUNES, 1982; COLAS, 1983; ROCA et al., 1992; TULI e HOLTZ, 1995), entre as épocas do ano com base na precipitação e umidade em clima tropical (PINHEIRO et al., 1996a; CATUNDA et al., 2009; CATUNDA et al., 2012), frequência (KAYA et al., 2002) e método de coleta do sêmen (RODRIGUES, 1997). Em ovinos, a frequência de coleta pode influenciar a composição iônica e a atividade enzimática no plasma seminal, bem como, os parâmetros espermáticos e produção diária de espermatozoides (KAYA et al., 2002).

Estudos em várias espécies sugerem que o plasma seminal contém fatores que influenciam na fertilidade do macho (AURICH et al., 1996; HENAULT et al., 1995; OLLERO et al., 1997). Outros estudos demonstraram que há diferenças entre as membranas dos espermatozoides 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 ou diminuem a fertilidade de touros (HENAULT et al., 1995).

Talvez a principal razão dessa diferença seja devido à grande variabilidade dos componentes bioquímicos do plasma seminal 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 e SAHNI, 1993). Esta variação pode ser responsável pelas notáveis diferenças na qualidade, congelabilidade e fertilidade do

sêmen nestas espécies (DHAMI e SAHNI, 1993). Estudos anteriores constataram que em caprinos, a presença do plasma seminal no meio de conservação interfere negativamente na viabilidade do sêmen congelado (CORTEEL, 1974).

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 e SIMMONS, 1952; PINHEIRO et al., 1996a). O problema é agravado pela falta de informação e desconhecimento da fisiologia do espermatozoide *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. Frutose do plasma seminal

Apesar da célula espermática não dispor de um grande número de organelas envolvidas com os processos do metabolismo energético, as mesmas 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 eletrolítico e possivelmente o desvio monofosfato hexose (MANN, 1974).

A principal função da frutose é suprir a via 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 se 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; LODGE e SALISBURY, 1963). Além disso, os espermatozoides utilizam a frutose pela via glicolítica convencional, como as outras células (FLIPSE e ANDERSON, 1969; HARRISON, 1971).

Estudos têm mostrado que a habilidade do espermatozoide 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, seguidos pela formação do monofosfato hexose até ácido láctico (MANN, 1945; MANN, 1946; KING et al., 2006).

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.

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). Na segunda via citada, a glicose é reduzida a sorbitol pela aldoreductase, e em seguida convertida em frutose pela oxidação do sorbitol na presença de NAD^+ e da enzima sorbitol desidrogenase (O'SHEA e WALES, 1965; MAYES e BENDER, 2003). Esta se constitui num componente seminal importante para o metabolismo do espermatozoide e seu nível reflete na qualidade espermática, na atividade metabólica e na função normal secretora da glândula vesicular (DHAMI e SAHNI, 1993).

SINGH e PENBEY (1995), avaliando a correlação existente entre os níveis de testosterona plasmática com 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 das concentrações de frutose no sêmen de caprinos.

A adição de frutose é essencial ao espermatozoide quando este for previamente lavado, a fim de manter ao máximo a atividade celular. Além disso, tem sido observado que o sêmen lavado produz menos ácido láctico (LODGE e SALISBURY, 1963), todavia não se sabe se as células lavadas são mais eficientes na oxidação dos produtos ácidos finais ou se algum componente essencial para a produção de ácido láctico foi removido pela lavagem. Os mesmos autores demonstraram que adição de hexose ao diluidor diminuiu o consumo de O_2 pelas células espermáticas lavadas durante a primeira hora de incubação.

ROCA et al. (1993), observando o efeito da variação estacional sobre as concentrações de frutose no plasma seminal de caprinos da raça Murciana-Granadina, constataram uma variação sazonal em ambos componentes, a concentração de frutose foi mais alta no verão e outono e mais baixa na primavera. O inverno foi considerado um período transicional.

PINHEIRO et al. (1996a) determinaram os parâmetros bioquímicos normais no plasma seminal de caprinos das raças Alpina, Moxotó e mestiços Alpina-Moxotó criados no Nordeste do Brasil, constatando que os valores encontrados para frutose 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 com a maior disponibilidade de alimento ocorrida durante a época chuvosa.

2.1.2. Fosfolipase A₂ do plasma seminal

A fosfolipase A₂ (FLA₂) é uma proteína de baixo peso molecular (13,2 kDa) e pI de 7.7 que faz parte de uma família de fosfolipases que catalisam a liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídios (LEE et al., 2003). Esta enzima tem sido encontrada no plasma seminal de humanos (RONKKO e RASANEN, 1992). As FLA₂ 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 FLA₂ 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).

As FLA₂ do grupo I comprespermatozoide da cauda do epidídimo e de enzimas encontradas no pâncreas de mamíferos, e em venenos de serpente apresentando peso molecular de 13 a 15 kDa, sendo constituídas de aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos ligados por sete pontes dissulfídicas. Essas enzimas são secretadas como zimogênios, manifestando atividade enzimática de forma limitada e somente através da clivagem proteica (CHACUR, 2004).

A atividade da FLA₂ pode ser mensurada por meio do decréscimo de lecitina, pelo aumento da liberação de ácidos graxos livres ou pelo aumento das lisolecitinas no plasma seminal (HAYAISHI, 1955). Em regiões de clima temperado, há um significativo efeito individual do macho caprino em relação ao efeito da FLA₂. 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 e LUTWAK-MANN, 1981, CHEMINEAU et al., 1991).

Durante a estação não reprodutiva, as glândulas bulbouretrais aumentam seu tamanho e sua atividade, sob influência das altas concentrações plasmáticas de prolactina e produzem mais FLA₂ (NUNES, 1982). Sias et al. (2005) demonstraram que a goat pancreatic-lipase-related protein 2 (GoPLRP₂) ou BUSgp 60 também dispara a 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 plasma seminal de caprino, esta enzima pode estar associada com a atividade reprodutiva de caprinos.

A FLA₂ está envolvida na modificação dos fosfolipídeos estruturais na membrana espermática e faz parte do processo de maturação dos espermatozoides epididimários (RONKKO e RASANEN, 1992; UPPRETI et al., 1999).

Contudo, a FLA₂ no sêmen caprino catalisa a hidrólise de lecitinas em lisolecitinas, que possuem ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática produzindo ácidos graxos livres, que são considerados tóxicos aos espermatozoides (ARAÚJO e CAMPOS, 2005). Baseado nesses achados sugere-se que a FLA₂ espermática pode ter ação moduladora da fusão da membrana nos eventos da fertilização em mamíferos (UPRETI et al., 1999).

A FLA₂ não foi identificada na superfície dos espermatozoides epididimários de bovinos (RONKKO e RASANEN, 1992). Sugerindo que diferentes FLA₂ podem estar presentes no plasma seminal, e que a FLA₂ pode ligar-se à superfície espermática durante a ejaculação (ROLDAN, 1998). Os mesmos autores sugerem que seria interessante verificar se a quantidade da atividade da FLA₂ detectada no espermatozoide corresponde as FLA₂ do plasma seminal que estão ligadas à superfície espermática.

2.1.3. As proteínas do plasma seminal

A composição proteica do plasma seminal de mamíferos varia entre as diferentes espécies, e tem importantes efeitos sobre a função espermática (VILLEMURE et al., 2003). Algumas proteínas do plasma seminal têm influência sobre a motilidade (SÁNCHEZ-LUENGO et al., 2004, HENRICKS et al., 1998), viabilidade e fertilização (BRANDON et al., 1999). Várias proteínas do plasma seminal tem sido descritas como fatores de infertilidade em equinos (BRANDON et al., 1999) e suínos (JONÁKOVÁ et al., 2007).

Deste modo, as proteínas do plasma seminal exercem múltiplos efeitos sobre a função espermática e desempenham um importante papel na capacitação dos espermatozoides, 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; JONÁKOVÁ et al., 2000; BARRIOS et al., 2000).

Alguns autores descreveram que a habilidade fertilizante do espermatozoide seria, em grande parte, determinada pelas proteínas espermáticas localizadas no acrossoma e peça intermediária, conhecidas como enzimas metabólicas especialmente ativas, cuja a sua

liberação em grandes quantidades podem indicar danos na membrana plasmática do espermatozoide (BITTMAR e KOSINIAK, 1992).

La Falci et al. (2002), estudando mudanças estacionais nos níveis de proteína totais no plasma seminal de caprinos (raça Saanen) manejados sob condições naturais no sul do Brasil (clima subtropical), encontraram uma importante diferença no padrão das proteínas entre a estação reprodutiva e a estação não reprodutiva, mas não encontraram diferença significativa entre as estações no que se refere a quantidade de proteínas presentes. Entretanto, os autores observaram que na estação reprodutiva foi encontrada uma proteína de maior peso molecular (178 kDa) do que àquelas encontradas na estação não reprodutiva (73-104 kDa). Atribuíram que tal diferença deve-se a estacionalidade, que tem relação com a função espermática.

Também tem sido sugerido que as proteínas do plasma seminal são importantes para a manutenção da motilidade em carneiros, para a melhoria da viabilidade espermática, e por protegerem a membrana plasmática dos espermatozoides de ovinos dos danos causados pelas baixas temperaturas de preservação (BARRIOS et al., 2000; PÉREZ-PÉ et al., 2001).

Em equinos, o aumento da concentração de proteínas no sêmen pouco concentrado diminuiu a congelabilidade do mesmo (BITTMAR e KOSINIAK, 1992). Estudos também têm demonstrado que algumas proteínas do plasma, como as BSPs, são responsáveis por promoverem o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana espermática (MOREAU e MANJUNATH, 2000), mesmo quando adicionada a espermatozoides do epidídimo (THÈRIEN et al., 1999).

2.1.4. Principais eletrólitos do plasma seminal

Diversos eletrólitos estão presentes no plasma seminal de mamíferos, dentre os mais importantes foram encontrados Na^+ , K^+ , Mg^{++} (GONZALES et al., 1984; PINHEIRO et al., 1996a); Cl^- , fosfatos, Ca^{++} (DHAMI e SAHNI, 1993; JAISWAL e CONTI, 2003) e Zn^{++} (KVIST, 1980).

As concentrações de cloreto no sêmen influenciam o potencial de membrana do espermatozoide e a motilidade em associação com os cátions. Os íons Cl^- , Na^+ e K^+ estão diretamente relacionados com a manutenção da excitabilidade da membrana espermática, pH ótimo do sêmen e pressão osmótica constante dentro e fora das células espermáticas (DHAMI e SAHNI, 1993).

Em ovinos, a concentração de íons Na^+ , Cl^- e PO_4^- no plasma seminal excedem àquelas do espermatozoide, enquanto a de potássio, cálcio e magnésio são maiores no espermatozoide (ABDEL-RAHMAN et al., 2000). Há correlação entre a concentração espermática e a de fósforo inorgânico no sêmen, indicando que o aumento é uma função do metabolismo da célula (EHRLERS et al., 1961).

Os íons Ca^{++} e HCO_3^- desempenham um papel crítico na regulação da função espermática, mais precisamente na regulação dos níveis de AMPc (JAISWAL e CONTI, 2003). Além disso, o cálcio induz a ativação da fosfolipase A_2 , a reação acrossômica e ambos os processos são inibidos pelo zinco (THAKKER et al., 1983). Níveis mais altos de K^+ e Ca^{++} no espermatozoide 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 espermatozoides vivos, onde uma percentagem mais alta de células vivas foram associadas com altos níveis de K^+ e Ca^{++} e baixa de PO_4^- (ABDEL-RAHMAN et al., 2000).

Em cães os íons K^+ , Mg^{++} e Ca^{++} aumentam a motilidade espermática quando adicionados ao sêmen não lavado, todavia, os resultados são maiores com o Mg^{++} e Ca^{++} do que com o K^+ (WALES e WHITE, 1958). Estes autores demonstraram que nesta espécie, o Mg^{++} e o K^+ têm efeito benéfico. Em bovinos e ovinos, os íons K^+ e o Ca^{++} afetaram significativamente a motilidade espermática, mas em nenhuma dessas espécies houve interação significativa do K/Ca, significando que o efeito de um íon sobre a motilidade não é dependente da concentração do outro (BLACKSHAW, 1953). Nestas espécies, o nível ótimo de adição de KCl foi 0,01M.

Outro aspecto importante observado foi à constatação de que a lavagem do sêmen de cão e ovino é prejudicial ao espermatozoide devido à acentuada perda do K^+ intracelular para o meio de lavagem (BLACKSHAW, 1953; WALES e WHITE, 1958), resultando em significativas perdas na motilidade. Em ovinos a adição de Ca^{++} aos espermatozoides tem efeito deletério sobre a motilidade em qualquer concentração, todavia, o mesmo não foi observado em cães, onde a adição de Ca^{++} aumentou a motilidade; em bovinos a adição de Ca^{++} não afetou significativamente a motilidade (BLACKSHAW, 1953; WALES e WHITE, 1958).

Na espécie caprina, foi observada que a concentração de cálcio, fósforo e magnésio no plasma seminal variou segundo a época do ano em região de clima tropical (CATUNDA, 2007), todavia, nenhuma correlação foi encontrada entre a concentração de Ca^{++} no plasma seminal e os parâmetros de motilidade e o vigor espermáticos (AGUIAR,

2008). Esses resultados demonstraram existência de diferenças metabólicas entre as diferentes espécies.

O'SHEA e 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. Em um recente estudo conduzido com sêmen caprino, foi encontrada correlação positiva da concentração de Mg^{++} no plasma seminal com a motilidade espermática apenas na época seca (AGUIAR, 2008).

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 coleta 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 espermatozoide 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 e 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 espermatozoide ejaculado, até este cátion ser removido, em estágios posteriores à transferência do genoma masculino.

Este estudo também sugere que há uma correlação direta entre a concentração de zinco no fluido seminal e a motilidade do espermatozoide, ressaltando que pequenas quantidades destes elementos são essenciais para a manutenção da motilidade espermática. Uma fraca correlação positiva foi encontrada entre a percentagem de espermatozoides 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).

Segundo Abdel-Rahman et al., 2000, é possível que tal distribuição dos íons entre a fração espermática e o plasma seminal pode promover as bases para a variação da qualidade do sêmen, devendo ser considerada na interpretação dos resultados obtidos na avaliação da fertilidade de ovinos (ABDEL-RAHMAN et al., 2000).

2.2. Espermatozoides epididimários

Os espermatozoides de mamíferos são levados dos testículos ao órgão copulatório através de um complexo sistema de ductos genitais. Deste modo a maior parte do sistema excretor é chamada de epidídimo. O epidídimo consiste em três regiões distintas e cada região é composta de um tipo diferente de epitélio de revestimento, sendo que a cauda do epidídimo de carneiro é o local onde o espermatozoide adquire a capacidade de deslocamento em linha reta (JAN MARTAN, 1969; GATTI et al., 2000).

O epidídimo e as glândulas sexuais anexas podem desempenhar um importante papel no metabolismo espermático, tais como a capacitação e a motilidade espermática. Segundo Amann (1986) o segmento inicial do epidídimo tem a função de reabsorção, enquanto o segmento intermediário tem a função de maturação espermática e o segmento terminal está envolvido com o armazenamento dos espermatozoides férteis. Além disso, a duração do trânsito epididimário varia com a espécie animal.

Os espermatozoides epididimários sofrem importantes mudanças estruturais e funcionais à medida que entram em contato com as secreções epididimárias e percorrem o epidídimo, uma vez que no processo de maturação dos espermatozoides epididimários estão envolvidas diversas proteínas provenientes do fluído epididimário (JOHNSTON et al., 2001).

Gatti et al. (2000) afirmaram que ocorre uma relação entre a secreção no epidídimo e a variação na composição da membrana espermática em ovinos. Estes autores sugeriram que uma proteína secretada pelo epitélio epididimário com 17 kDa exerce papel na motilidade espermática. Além disso, algumas proteínas hidrofóbicas encontradas no

epidídimo poderiam estar envolvidas no transporte, transferência ou transformação de lipídios.

Alguns autores sugerem ainda que existem diferenças fisiológicas entre os espermatozoides epididimários e ejaculados. Contudo, devem existir outros fatores que contribuem para a resistência dos espermatozoides epididimários além do conteúdo lipídico das gotas citoplasmáticas. Os espermatozoides epididimários foram mais resistentes ao choque térmico e a altas temperaturas do que os espermatozoides ejaculados (WHITE e WALES, 1961; LASLEY e BOGART, 1944).

Lasley e Bogart (1944) revelaram que cerca de 51,2 % dos espermatozoides epididimários de suíno sobreviveram por 16 dias, em solução fosfato a 12° C, enquanto que apenas 9,6 % dos espermatozoides ejaculados sobreviveram nestas condições, por igual período. Os mesmos autores afirmaram que os espermatozoides epididimários na presença do plasma seminal têm a mesma resistência que na presença de secreções epididimárias. Com isto, concluíram que a resistência dos espermatozoides epididimários reside na célula e não no meio de suspensão.

Halangk et al. (1990) constataram que a taxa respiratória, a motilidade e o consumo de ATP dos espermatozoides epididimários de bovinos foram mais baixos que dos espermatozoides ejaculados e que os substratos endógenos dos espermatozoides epididimários são suficientes para manutenção deste baixo metabolismo. Contudo, para o aumento da atividade metabólica, os espermatozoides epididimários necessitam de substratos exógenos tais como a frutose. Os espermatozoides epididimários de bovinos metabolizam o piruvato através do ciclo do ácido cítrico (VAN DOP et al., 1977). Os autores afirmaram que, para a produção de ATP, os espermatozoides epididimários de bovinos podem utilizar um caminho distinto da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, a adição de frutose ao espermatozoides epididimários reestabeleceu a motilidade, porém a adição de lactato, acetato e acetoacetato não foram eficazes para a motilidade (VAN DOP et al., 1977).

2.3. Diluidores

Os diluidores sintéticos mais comumente utilizados para diluir sêmen de carneiro, para inseminação artificial vaginal ou cervical contêm 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 (EVANS e MAXWELL, 1990).

O metabolismo espermático resulta numa grande quantidade de metabólitos tóxicos, acarretando o aumento da concentração de íon de hidrogênio e ácido láctico no meio extracelular. Este acúmulo pode causar a morte das células espermáticas devido à drástica diminuição do pH no meio (FARSTAD, 1996; HOLT, 2000b). Por esse motivo, os diluidores de sêmen devem conter material nutriente para o espermatozoide, além de possuir uma capacidade tamponante para neutralizar os produtos de seu metabolismo e assim, manter um pH adequado para sua sobrevivência (MCDONALD, 1947). Por isso, a composição e o equilíbrio dos constituintes na formulação de um diluidor de sêmen é um aspecto essencial (EVANS e MAXWELL, 1990; SALAMON e MAXWELL, 2000).

2.3.1. Tris-gema

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano- $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) é o principal componente básico dos diluentes de sêmen caprino utilizados rotineiramente (CHOE et al., 2006; DORADO et al., 2007). Ele é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (MCPHAIL e GOODMAN, 1984).

De acordo com Farstad (1996), muitos pesquisadores continuam a utilizar o tampão TRIS-frutose original, enquanto outros preferem aperfeiçoar este tampão substituindo a frutose pela glicose ou pelos dissacarídeos não penetrantes como sacarose e lactose, que podem ainda agir como crioprotetores extracelulares.

Os diluidores contendo Tris como constituinte principal são adequados para a conservação do sêmen de carneiro (EVANS e MAXWELL, 1990). Além disso, o Tris tem maior poder tampão que o fosfato e o citrato e, pode ultrapassar a membrana plasmática e reduzir as variações intracelulares de pH (SALAMON e MAXWELL, 2000). A composição do diluidor Tris gema está expressa no quadro 1.

QUADRO 1 – Composição do diluidor tris-gema (TG) para o sêmen caprino

Constituinte	Peso (g)
TRIS – hidroximetil aminometano	3,63
Frutose	0,50
Ácido cítrico – monohidratado	1,99
Gema de ovo (mL)	2,50
Água destilada q.s.p. (mL)	100

Fonte: EVANS e MAXWELL “Inseminación artificial de ovejas y cabras”, 1990

2.3.2. Citrato-gema

O citrato é a designação genérica dos sais do ácido cítrico. Sendo o principal nutriente produzido pela próstata como suporte para os espermatozoides. O citrato de sódio (citrato trissódico - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) é o sal de sódio do ácido cítrico e um agente tamponante que resiste a mudanças no pH do meio (WIKIPÉDIA, 2009).

Evans e Maxwell (1990) adicionam, ainda, glicose como fonte de energia (Quadro 2). O citrato de sódio aumenta a diluição da gema de ovo no meio líquido, favorecendo sua ação sobre os espermatozoides e, atua ainda, como quelante de cálcio, diminuindo a quantidade que atravessa a membrana espermática (HOLT, 2000a).

QUADRO 2 – Composição do diluidor citrato-gema (CG) para o sêmen caprino

Constituinte	Peso (g)
Citrato sódico – $2\text{H}_2\text{O}$	2,37
Glicose	0,80
Gema de ovo (mL)	2,50
Água destilada q.s.p. (mL)	100

Fonte: Evans e Maxwell. “Inseminación artificial de ovejas y cabras”, 1990

2.3.3. Gema de ovo

A gema de ovo, um componente comumente acrescentado aos diluentes, tem demonstrado efeitos benéficos no resfriamento do sêmen (BLACKSHAW e SALISBURY, 1957; 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 e 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 para 5 °C (BLACKSHAW e SALISBURY, 1957; FISER e FAIRFULL, 1986). Alguns estudos indicam que a fração lipoproteica 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 e 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 lipoproteica da gema de ovo serve para solubilizar o lipídio e ligá-lo à membrana da célula (WATSON, 1981).

A gema de ovo é amplamente utilizada para criopreservação do sêmen caprino, com bons resultados, quando utilizada na concentração de 2 a 2,5% para sêmen resfriado (CAMPOS et al., 2003; CAMPOS et al., 2004; ROCA et al., 1997) e de 9 a 20% para congelação (CABRERA et al., 2005; EIMAN et al., 2004; GIL et al., 2003; PÉREZ LLANO e MATEOS REX, 1995; CHAUHAN e ANAND, 1990). 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, uma vez que foram realizados melhoramentos pela proteção adicional do espermatozoide durante o armazenamento em meio contendo gema de ovo (DE PAUW et al., 2003a; DE PAUW et al., 2003b).

Blackshaw e Salisbury (1957) mostraram que a adição de gema de ovo aos diluidores teve efeito altamente benéfico sobre o metabolismo espermático bovino após o choque térmico, e que também teve ação estimulatória geral sobre o metabolismo quando comparado ao grupo controle (sem gema). Os mesmos autores afirmam que a gema de ovo e a lecitina reduzem os danos causados pelo choque térmico, entretanto a gema de ovo foi mais eficiente.

Em caprinos, melhores resultados de porcentagens de motilidade, motilidade progressiva e regeneração dos espermatozoides foram encontradas no diluidor contendo gema de ovo (EIMAN et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar o efeito do plasma seminal sobre a viabilidade do sêmen caprino resfriado a +5°C em diferentes diluidores.

3.2. ESPECÍFICO

- Avaliar os diluidores Tris-gema e Citrato-gema e o resfriamento a +5°C sobre a viabilidade de espermatozoides ejaculados lavados a 0 (fresco), 2 e 24 horas de conservação;
- Analisar o efeito do plasma seminal quando adicionado aos espermatozoides da cauda do epidídimo diluídos em Tris-gema e Citrato-gema a 0 (fresco), 2 e 24 horas de conservação a +5 °C;
- Verificar se as concentrações de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio, sódio e atividade da fosfolipase A2 presentes no plasma seminal influenciam a viabilidade de espermatozoides ejaculados e provenientes da cauda do epidídimo conservados a 5°C por até 24h;
- Observar a ocorrência de possíveis diferenças na viabilidade dos espermatozoides ejaculados e da cauda do epidídimo conservados em presença e ausência de plasma seminal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

O experimento foi realizado durante os meses de janeiro e fevereiro de 2008 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 15,5 m acima do nível do mar, e com clima do tipo AW, quente e úmido, segundo a classificação de Koeppen.

4.2. Animais experimentais

Foram utilizados oito machos caprinos mestiços, com $40 \pm 5,91$ meses de idade, criados sob condições intensivas e arraçoados segundo NRC (1981) para caprinos, contendo 16% de proteína bruta (PB). A relação volumoso: concentrado foi de 60:40. O volumoso fornecido foi o feno tifton 85. A suplementação mineral se constituiu da adição de 0,8% de calcário e 2% de suplemento mineral comercial Caprinofós® 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-caprinos.

4.3. Coleta do plasma seminal

O plasma seminal utilizado no experimento foi previamente obtido a partir de ejaculados coletados dos animais experimentais, em dias alternados, por um período de 20 dias. O sêmen dos caprinos foi coletado por meio de vagina artificial com tubo coletor acoplado à extremidade e com o auxílio de uma cabra como manequim para a monta dos animais. Antes da coleta, os animais tiveram o prepúcio lavado com água e detergente neutro e depois enxuto com papel toalha para evitar contaminação do sêmen. Após a coleta, o sêmen foi centrifugado a 2500 g/ 20 min./ 5° C e o sobrenadante, ou seja, o plasma seminal foi removido e transferido para tubos tipo eppendorfs. Cada tubo foi devidamente identificado por animal e as amostras foram conservadas a -18 °C em freezer. Ressalta-se que ao final do período de coletas, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente por um período máximo de 10 min. Em seguida, procedeu-se uma

mistura do plasma seminal que foi obtido por animal, para eliminar efeito de coleta. As amostras individuais foram, então, redistribuídas em pequenas alíquotas de 0,5 mL em tubos eppendorffs e novamente armazenados a -18° C até a realização das análises bioquímica e adição aos espermatozoides da cauda do epidídimo. Esta medida foi adotada para evitar descongelações desnecessárias das amostras.

4.4. Preparo dos diluidores

Foram utilizados os diluidores Citrato-Gema 0,09M (2,37 g de citrato de sódio; 0,80 g de glicose em água destilada q.s.p. 100 mL e TRIS-Gema 0,3M (3,634 g de TRIS; 0,50 g de frutose, 1,99 g de ácido cítrico em água destilada q.s.p. 100 mL, preparados segundo Evans e Maxwell (1990) e conservados a 5 °C até sua utilização, quando foi acrescido 2,5% de gema de ovo em ambos diluidores.

4.5. Coleta e processamento do sêmen

As coletas foram realizadas em dois dias alternadamente pelo período da manhã já que a castração seria realizada no período da tarde, no primeiro dia de coleta foram coletados de quatro animais e o restante no segundo. O sêmen dos animais foi coletado por meio de vagina artificial com tubo coletor acoplado a extremidade e com o auxílio de uma cabra como manequim para monta dos animais. Antes da coleta, os animais tiveram o prepúcio lavado com água e detergente neutro e enxuto com papel toalha para evitar contaminação do sêmen. Após a coleta, o volume de cada ejaculado foi mensurado com uma pipeta individualmente e a concentração espermática determinada por espectrofotometria (Spectrophotometer 1105, Bell photonics). Em seguida, foram retiradas duas alíquotas de 100µL: a primeira foi diluída a uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/ mL, no diluidor Citrato-gema (CG) e a segunda foi diluída na mesma concentração no diluidor Tris-gema (TG), para o qual foi utilizada a seguinte fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, metade de cada amostra de sêmen diluído foi resfriado a +5°C (tratamento: sêmen não-lavado). Antes do resfriamento uma alíquota de 300 µL foi retirada para a realização do teste de termorresistência a 0h (fresco) aos 5, 60, e 120 minutos. Os tubos contendo o restante das amostras de sêmen diluído foram acondicionados em béquer com água a temperatura ambiente e este colocado dentro da geladeira, na qual a temperatura era

mensurada frequentemente com a finalidade de obter uma curva de resfriamento de 0,27°C/min. Até 5°C. Esse procedimento foi realizado com o intuito de minimizar o choque térmico sobre as células espermáticas. A outra metade foi centrifugada (lavagem) para retirada do plasma seminal sendo também resfriada a +5°C (tratamento: sêmen lavado), retirando-se antes do resfriamento a alíquota de 300 µL para a realização do teste de termorresistência a 0h aos 5, 60, e 120 minutos. A lavagem foi realizada duas vezes utilizando-se a mesma solução diluidora (centrifugado a 550 G / 15 min./ 25°C), tendo-se o cuidado de manter o volume líquido do diluidor após cada lavagem e assim manter a mesma concentração espermática. Ambas as amostras de sêmen foram avaliadas também a 2 e 24 h de resfriamento, das quais foram retiradas amostras de 300 µL e incubadas em banho-maria a 38°C/ 2 h, avaliado-se a motilidade expressa em percentagem (0-100%) e o vigor (0-5), por meio do teste de termoresistência aos 5, 60, e 120 minutos de incubação de cada tempo de conservação a +5°C.

4.6. Avaliação bioquímica do plasma seminal

O plasma seminal obtido e conservado a -18 °C foi avaliado quanto à concentração de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio, sódio e atividade da fosfolipase A₂. Para a determinação dos níveis de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio e sódio foram utilizados os kits específicos da In Vitro Diagnóstico S/A[®]. A atividade da PLA₂ foi mensurada através da metodologia de Haas et al. (1968), descrita a seguir. Como substrato, preparou-se uma solução de gema de ovo com 50 mL de água destilada e a uma alíquota de 15 mL desta solução foram adicionados 10 mL de deoxicolato de sódio a 0,03 M e 1 mL de CaCl₂ a 0,6 M. Água destilada foi adicionada em seguida, até completar 100 mL, de forma que a concentração final do deoxicolato de sódio e o CaCl₂ foram de 3×10^{-3} e 6×10^{-3} , respectivamente. O pH desta solução foi corrigido para 7,8 a 8,0 utilizando-se NaOH a 0,5 M. Desta solução, uma alíquota de 10mL foi retirada e levada ao pHmetro e adicionada de 20 µL de plasma seminal caprino. Uma alíquota de 3 µL de NaOH a 0,11 N foi adicionada sempre que o pH da solução diminuía em 0,03 e o tempo (em segundos) aferido, de modo que o ensaio teve duração de três minutos. No final do ensaio, foi calculada a média das diferenças dos tempos anotados, multiplicada por um fator de correção, com a finalidade de determinar a unidade de consumo de NaOH /min./ 20µL de plasma seminal caprino adicionado à solução de uso. Todas as determinações dos componentes bioquímicos do plasma seminal foram realizadas

em triplicata e a média dos três resultados foi utilizada para as análises estatísticas. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA) da Universidade Federal do Ceará.

4.7. Castração e obtenção dos espermatozoides da cauda do epidídimo

Para castração cirúrgica, os animais foram previamente sedados com Cloridato de Xylazina 2% (Rompum®) e em seguida, foi aplicado Cloridrato de Lidocaína 2% (Anestésico L Pearson, Eurofarma) no cordão espermático e sob a pele do saco escrotal para indução de anestesia local. Posteriormente, realizou-se uma incisão na porção caudal do escroto, de modo a expor os testículos, um de cada vez, que foram cirurgicamente removidos após sutura dos componentes do funículo espermático. Em seguida, os testículos e os epidídimos foram encaminhados ao LERA (Laboratório de Estudos em Reprodução Animal – UFC) em até 2 minutos, onde foram imediatamente separados e os espermatozoides foram coletados após divulsionamento dos vasos visíveis na superfície da cauda do epidídimo, onde foram feitas pequenas incisões permitindo assim a coleta dos espermatozoides em tubos de ensaio. Foi feito um “pool” dos espermatozoides das duas caudas do epidídimo e em seguida, foram retiradas quatro alíquotas de 100 µL desse “pool” e postas em tubos de ensaio. Em duas das amostras foram adicionados 120 µL de plasma seminal autólogo a temperatura ambiente, ou seja, o plasma seminal e os espermatozoides da cauda do epidídimo pertenciam ao mesmo animal. Ressalta-se que o volume de plasma seminal foi adicionado conforme o descrito por Lima et al (2006), que observaram que o volume de plasma seminal presente no sêmen representava 55% do volume total. As outras duas amostras constituíram o grupo controle, ou seja, sem acréscimo de plasma seminal. Em seguida, uma das amostras contendo espermatozoides e plasma seminal (i) e outra contendo apenas espermatozoides (controle - ii) foram diluídas no diluidor citrato-gema. As outras duas amostras com plasma seminal (iii) e sem plasma seminal (controle - iv) foram diluídos no TRIS-gema a uma concentração final de 200×10^6 sptz/ mL para os dois diluidores, para o qual foi utilizada a seguinte fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. Imediatamente após a diluição foi retirada uma alíquota de 300 µL de cada amostra de sêmen diluído e incubada em banho-maria a 38°C/2h para avaliação da motilidade e do vigor a 0h (fresco) aos 5, 60, e 120 minutos de incubação, por meio do teste de termorresistência e o restante foi resfriado a +5°C, os tubos contendo as amostras

de espermatozoides da cauda do epidídimo diluídos foram acondicionados em béquer com água a temperatura ambiente e este colocado em água a +5°C dentro da geladeira, na qual a temperatura era mensurada frequentemente a fim de manter a temperatura constante, esse procedimento foi realizado com o intuito de minimizar o choque térmico sobre as células espermáticas e após o período de 2 e 24h foram retiradas amostras de 300 µL e incubadas em banho-maria a 38°C/ 2 h, para uma nova avaliação da motilidade e do vigor, por meio do teste de termoresistência aos 5, 60, e 120 minutos de incubação de cada tempo de conservação a 5°C.

4.8. Morfologia espermática

Foram confeccionados em lâminas, esfregaços de sêmen das amostras de cada animal aos 120 minutos de incubação a 38°C dos diferentes tempos de conservação (0, 2 e 24 h) para observação de possíveis alterações morfológicas. Os esfregaços foram corados com solução de azul de bromofenol. Um total de 200 células foi avaliado em microscopia óptica de imersão (1000 X). A morfologia espermática foi classificada segundo BLOM (1973): em normais (NOR), defeitos maiores (DEMA) e defeitos menores (DEME), expressos em números reais.

4.9. Separação dos grupos

Após a determinação da concentração de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio, sódio e atividade da FLA2 os animais foram divididos em dois grupos distintos para cada componente bioquímico (Quadro 3):

QUADRO 3: Média dos grupos de acordo com a concentração bioquímica.

Parâmetro	Grupo	Grupo
Frutose	> 650 mg/dL (A1)	< 540 mg/dL (A2)
Proteínas Totais	> 4,3 g/dL (B1)	< 4,0 g/dL (B2)
Atividade FLA2	> 11U/mL (C1)	< 7U/mL (C2)
Cloretos	>350 mg/dL (D1)	< 350 mg/dL (D2)
Potássio	>141 mg/dL (E1)	≤141 mg/dL (E2)
Sódio*	>175mg/dL (F1)	<175mg/dL (F2)

*não houve diferença significativa entre os grupos.

4.10. Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SAS[®]. O delineamento experimental empregado foi o delineamento inteiramente casualizado. Para os dados expressos em percentagem, procedeu-se primeiramente a transformação angular, com o objetivo de atender à condição de normalidade necessária a este tipo de análise. Os parâmetros espermáticos foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM, para os efeitos significativos a comparação das médias ajustadas foi feita pelo teste t-Student a 5% de probabilidade de erro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação dos parâmetros seminais de espermatozoides ejaculados de caprinos

Todas as variáveis deste estudo (motilidade, vigor, nº de espermatozoides com DEME, DEMA e normas) foram submetidas aos efeitos de grupo, diluidor, tratamento e tempo, bem como à interação entre estes efeitos, porém as variáveis que não diferiram significativamente não foram abordadas neste relato.

O estudo da análise de variância mostrou que não houve interação significativa entre os efeitos diluidor e tratamento sobre as variáveis estudadas. Apenas o tempo de conservação, quando avaliado isoladamente, afetou a motilidade, o vigor, o número de espermatozoides com DEME e normais (Tabela 1). Já os espermatozoides DEMA foram afetados pela interação entre tratamento e tempo (Tabela 2).

Desse modo, quando os dados foram analisados sem levar em consideração as concentrações seminais de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio e a atividade da FLA₂, os seguintes resultados foram encontrados: houve um decréscimo nos valores de motilidade, vigor e de espermatozoides normais à medida que o tempo de conservação foi prolongado, o que demonstrou que a célula espermática de caprinos é muito sensível à refrigeração, mesmo sob condições controladas e utilizando meio de conservação apropriado.

Essa sensibilidade explica o aumento significativo no número de células espermáticas com DEME após 2 horas de conservação (Tabela 1). No T0 foram encontrados os melhores valores para motilidade, vigor, espermatozoides normais e com DEME (Tabela 1). Resultados similares foram encontrados por diversos autores (MATOS-BRITO, 2008; ISLAM et al., 2005; LEBOUF et al., 2003).

Foi constatada interação significativa entre os efeitos tratamento e tempo para os espermatozoides com DEMA (Tabela 2). Nos T2 e T24 foi observado que a presença de plasma seminal, sêmen não lavado, aumentou a incidência desses defeitos.

O presente estudo evidenciou, mais uma vez, o efeito deletério do plasma seminal sobre as células espermáticas provenientes do ejaculado. Acredita-se que, com a remoção do plasma seminal, elimina-se também, os possíveis constituintes que possam vir afetar negativamente a qualidade do sêmen resfriado.

Tabela 1. Médias e desvio-padrão de motilidade, vigor, espermatozoides normais e com defeitos menores (DEME) em diferentes tempos de conservação.

Parâmetros	Tempo		
	T0	T2	T24
Motilidade	67,5 ± 10,86 ^a	57,03 ± 15,86 ^b	47,86 ± 21,61 ^c
Vigor	2,88 ± 0,49 ^a	2,33 ± 0,74 ^b	2,08 ± 0,89 ^b
DEME	9,71 ± 7,34 ^a	8,97 ± 5,99 ^a	16,41 ± 10,46 ^b
Normais	184,00 ± 8,66 ^a	181,00 ± 8,94 ^a	172,97 ± 11,90 ^b

Letras minúsculas: comparação entre tempos de conservação, no mesmo parâmetro (p<0,05).

Tabela 2. Médias e desvio-padrão dos espermatozoides com defeitos maiores (DEMA) do sêmen lavado e não lavado em diferentes tempos de conservação.

Tratamento	Tempo		
	T0	T2	T24
Lavado	7,27 ± 4,35	7,69 ± 4,45 ^A	8,56 ± 5,28 ^A
Não lavado	5,37 ± 3,91 ^a	12,71 ± 6,68 ^{bB}	12,69 ± 6,86 ^{Ba}

Letras minúsculas: comparação entre tempos de conservação no mesmo tratamento; Letras maiúsculas: comparação entre tratamentos no mesmo tempo de conservação, (p<0,05).

5.2. Avaliação dos parâmetros seminais do ejaculado em função das concentrações de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio e a atividade da FLA₂ no plasma seminal.

O estudo da análise de variância mostrou que o efeito da frutose, grupo, sobre a conservação dos espermatozoides ejaculados, foi significativo (p<0,05) apenas para a interação grupo e tempo de conservação, aumentando a incidência de espermatozoides com DEME (Tabela 3). As maiores incidências de DEME foram encontradas no grupo A2, em T0 em T24, porém, em T2 observou-se um decréscimo na ocorrência de DEME.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Matos-Brito et al.(2012, no prelo). De acordo Blackshaw and Salisbury (1957), a adição de gema de ovo ao diluidor estimula a atividade glicolítica dos espermatozoides presentes no sêmen fresco. Outros estudos revelaram a ocorrência de morte dos espermatozoides de caprinos diluídos em diluidor acrescido de gema de ovo e incubados a 37° C/2h (RITAR e SALAMON, 1982). Deste modo, a adição de gema de ovo ao sêmen fresco pode ser um fator de redução da

qualidade seminal em caprinos. Para os demais parâmetros seminais avaliados não foi constatada interação significativa ($p > 0,05$).

Tabela 3. Medias e desvio-padrão dos espermatozoides com defeitos menores (DEME) nos grupos A1 e A2 nos diferentes tempos de conservação.

Grupo	Tempo		
	T0	T2	T24
A1	$4,25 \pm 3,21^{Aa}$	$9,81 \pm 7,06^b$	$13,06 \pm 7,81^{bA}$
A2	$15,53 \pm 5,83^{Bb}$	$8,00 \pm 4,54^a$	$19,75 \pm 11,88^{bB}$

Letras minúsculas: comparação entre tempo de conservação no mesmo grupo; Letras maiúsculas: comparação entre grupos no mesmo tempo de conservação, ($p < 0,05$).

No grupo A2 observou-se um maior índice de espermatozoides com DEME em T0 e T24. Isoladamente, o grupo (Tabela 4) e o tempo de conservação (Tabela 1), influenciaram significativamente, o vigor, a motilidade e os espermatozoides com DEMA. Neste experimento, os melhores resultados foram encontrados no grupo A2 (frutose < 540 mg/dL). Conforme Bloom (1973), os defeitos maiores dizem respeito a qualquer anormalidade que tenha sido relacionada com infertilidade ou condição patológica do testículo ou do epidídimo. Já os defeitos menores, também podem causar infertilidade, mas é provável que possa haver fertilização.

Tabela 4. Medias e desvio-padrão de motilidade, vigor e DEMA dos grupos A1 e A2.

Parâmetros	Grupo	
	A1	A2
Motilidade	$50,73 \pm 22,15^b$	$64,20 \pm 9,99^a$
Vigor	$2,07 \pm 0,92^b$	$2,79 \pm 0,41^a$
DEMA	$10,33 \pm 6,62^b$	$7,55 \pm 4,65^a$

Letras minúsculas: comparação entre grupos no mesmo parâmetro, ($p < 0,05$).

Alguns estudos encontraram correlação negativa entre o nível de frutose e a concentração e motilidade espermáticas (ERB et al., 1956; FREUND e MURPHREE, 1959; LU et al., 2007). Freund e Murphree (1959) sugeriram que a eficiência na utilização de frutose pode estar relacionada a diferenças na concentração espermática, na concentração de frutose inicial e na motilidade espermática inicial. Outros estudos

afirmaram que a frutose se constitui em um componente seminal importante para o metabolismo do espermatozoide e que seu nível reflete-se na qualidade espermática, na atividade metabólica e na função normal secretora da glândula vesicular (DHAMI e SAHNI, 1993). Contudo, mais estudos necessitam ser conduzidos para esclarecer porque o grupo com menor concentração de frutose no plasma seminal propiciou melhores índices de vigor, motilidade e menos células espermáticas com DEMA provenientes do ejaculado.

A atividade da FLA₂ foi significativa ($p < 0,05$) e o grupo exerceu efeito sobre o número de espermatozoides normais, onde o melhor resultado foi observado no grupo C1 ($181,13 \pm 9,96$), contra $175,94 \pm 11,91$ no grupo C2.

Em caprinos, a atividade da FLA₂ tem sido relatada como a principal responsável pela má conservação do sêmen dessa espécie (NUNES, 1982). A fosfolipase 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 espermatozoides. Em adição, a lecitina é o principal fosfolipídio nas membranas plasmáticas dos espermatozoides e está contida na gema de ovo, sendo portanto, substrato perfeito para ação hidrolítica da fosfolipase (ARAÚJO & CAMPOS, 2005). No presente estudo, o efeito deletério parece não ter ocorrido apesar de confirmada a atividade da FLA₂ sua ação não comprometeu a qualidade seminal em caprinos SPRD criados em clima tropical. Sias et al. (2005) encontraram alta intensidade na atividade da FLA₂ em animais de clima temperado. Os valores médios encontrados pelos autores foram 90 U/mL contra 11 U/mL que foram constatados no grupo A no presente estudo. Resultados semelhantes foram constatados por Matos-Brito et al. (2012, no prelo).

A concentração de proteínas totais no plasma seminal não teve efeito significativo sobre os parâmetros estudados.

Todavia, quando os dados foram agrupados em função da concentração de cloretos no plasma seminal de caprinos, o efeito de grupo foi significativo para a motilidade e o vigor ($p < 0,05$) (Tabela 5). Em bovinos, uma maior concentração de cloretos no plasma seminal está relacionada à infertilidade (ÇEVIK et al., 2007) e em ovinos, uma menor concentração de cloretos possibilitou uma melhor motilidade (ABDEL-RAHMAN et al., 2000). Estes achados estão de acordo com os encontrados no presente estudo, pois os melhores índices foram observados no grupo D2 (cloretos < 350 mg/dL).

Tabela 5. Médias e desvio-padrão de motilidade e vigor do sêmen de animais divididos em dois grupos de acordo com a concentração de cloretos no plasma seminal.

Parâmetro	Grupo	
	D1	D2
Motilidade	52,47±20,20 ^b	65,78±10,75 ^a
Vigor	2,21±0,87 ^b	2,79±0,45 ^a

Letras minúsculas: comparação entre grupos para o mesmo parâmetro, (p<0,05).

Ainda no que se refere à concentração de cloretos no plasma seminal de caprinos, foi observada interação significativa entre grupo e tempo de conservação (p<0,05) sobre o número de espermatozoides normais e com DEME (Tabela 6). As diferenças entre os grupos só foi observada em T0, com os melhores resultados sendo encontrados no grupo D1. Contudo, Çevk et al. (2007) não verificaram efeito do cloreto seminal sobre as características morfológicas em bovinos.

Tabela 6. Médias e desvio-padrão do número de espermatozoides normais e com DEME no sêmen de animais divididos em dois grupos de acordo com a concentração de cloretos no plasma seminal, em diferentes tempos de conservação.

Variáveis	Grupo	Tempo		
		T0	T2	T24
DEME	Grupo D1	5,79 ± 4,84 ^{aA}	9,00 ± 6,53 ^a	15,55 ± 9,74 ^b
	Grupo D2	15,92 ± 6,33 ^{bB}	8,90 ± 5,06 ^a	17,83±11,86 ^b
Normais	Grupo D1	187,89±6,31 ^{aA}	180,60±9,62 ^b	172,25±11,05 ^c
	Grupo D2	177,83±8,46 ^B	181,80±7,81	174,17±13,62

Letras minúsculas: comparação entre tempo de conservação no mesmo grupo; Letras maiúsculas: comparação entre grupos no mesmo parâmetro avaliado, (p<0,05).

Quando a concentração de cloretos no plasma seminal foi maior que 350 mg/dL constatou-se uma diminuição significativa no número de espermatozoides normais. Entretanto, quando a concentração de cloreto foi menor que 350 mg/dL constatou-se que em T2 houve uma redução no número de células com DEME (Tabela 6). Atribui-se a este fato, uma possível adaptação das células espermáticas ao meio, em função do aumento inicial do metabolismo promovido pela adição de gema de ovo ao diluidor no sêmen fresco, conforme anteriormente relatado por Blackshaw and Salisbury (1957) e constatado

por Matos-Brito et al. (no prelo). Outros estudos constataram que a lesão primária associada ao choque térmico ocorre principalmente na membrana plasmática, resultando em consideráveis alterações morfológicas. Além disso, mudanças importantes na permeabilidade são resultantes dessa injúria.

A concentração de potássio no plasma seminal influenciou significativamente ($p < 0,05$) o vigor. Quando a concentração foi menor ou igual a 141,0 mg/dL (grupo E2), o vigor foi melhor ($2,65 \pm 0,41$). Este resultado está de acordo com o observado por Abdel-Rahman et al. (2000) em ovinos.

Altas concentrações de K^+ e Ca^{++} no espermatozoide causaram redução na atividade espermática em ovinos nativos e Merinos (ABDEL-RAHMAN et al., 2000). Tais resultados foram similares aos observados no atual experimento com sêmen caprino, pois concentrações mais baixas de cloreto e potássio no plasma seminal indicaram melhor qualidade espermática.

Apesar de ter sido mensurada, a concentração de sódio no plasma seminal de caprinos não variou significativamente entre os animais ($157,37 \pm 63,38$ mg/dL), não constituindo deste modo, efeito de grupo.

5.3. Resultados sobre os parâmetros seminais de espermatozoides da cauda do epidídimo

Analisando-se os dados sem considerar efeito de grupo foram encontradas interações duplas e significativas entre os efeitos tratamento e o tempo de conservação sobre as variáveis motilidade e vigor, bem como, interações isoladas do diluidor e do tempo de conservação sobre o número de espermatozoides com DEMA.

Com base neste estudo foi possível constatar que o plasma seminal agiu negativamente sobre a qualidade seminal (vigor e motilidade) dos espermatozoides da cauda do epidídimo de caprinos, em todos os tempos de conservação (Tabela 7). Entretanto foi possível constatar que praticamente não houve degradação da qualidade espermática nas amostras sem plasma seminal. O efeito negativo da adição de plasma seminal confirmou o que já havia sido relatado em outros estudos, isto é, que o plasma seminal de caprinos tem efeito deletério sobre a viabilidade espermática (ROY, 1957; CORTEEL, 1974; NUNES, 1982; CAMPOS et al., 2004; SIAS et al., 2005; AGUIAR, 2008).

Tabela 7. Médias e desvio-padrão de motilidade e vigor de espermatozoides epididimários tratados com e sem adição de plasma seminal em diferentes tempos de conservação.

Parâmetro	Tratamento	Tempo		
		T0	T2	T24
Motilidade	Com plasma	52,08±14,39 ^{ab}	43,33±14,84 ^{ab}	25,42±26,69 ^{bb}
	Sem plasma	72,55±7,17 ^A	60,00±7,50 ^A	59,37±14,31 ^A
Vigor	Com plasma	2,04±0,46 ^{ab}	1,88±0,56 ^{ab}	1,05±1,10 ^{bb}
	Sem plasma	3,13±0,34 ^{aA}	2,41±0,46 ^{bA}	2,54±0,67 ^{bA}

Letras minúsculas: comparação entre os tempos de conservação no mesmo tratamento; Letras maiúsculas: comparação entre tratamentos no mesmo parâmetro avaliado. ($p < 0,05$).

Quanto constatada à interação significativa ($p < 0,05$) entre diluidor e tempo de conservação sobre os espermatozoides da cauda do epidídimo com DEMA, verificou-se que, em CG ($5,21 \pm 3,98$) foi encontrado o menor número de espermatozoides da cauda do epidídimo com DEMA do que em TG ($7,43 \pm 5,45$). Semelhantemente, o prolongamento do tempo de conservação promoveu um aumento significativo desses DEMA sobre os espermatozoides da cauda do epidídimo em T24 ($8,00 \pm 5,13$), independente do meio diluidor.

Analisando-se as concentrações de frutose, proteínas totais, cloretos, potássio e a atividade da FLA₂ no plasma seminal, os seguintes resultados foram encontrados: A concentração de frutose no plasma seminal mostrou efeito significativo, quando analisada a interação tripla entre grupo, tratamento e tempo de conservação sobre a motilidade. Entretanto, a diferença entre os grupos experimentais só foi verificada com 24 horas de conservação no tratamento com plasma seminal, de forma que os melhores índices foram encontrados no grupo A1 (Tabela 8).

Tabela 8. Médias e desvio-padrão de motilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo nos grupos A1 e A2 conservados em diferentes tempos com ou sem adição plasma seminal.

Grupo	Tratamento	Tempo		
		T0	T2	T24
Grupo A1	Com Plasma	56,46±14,89 ^{ab}	50,83±14,42 ^a	35,00±20,16 ^{bb1}
	Sem Plasma	76,35±6,75 ^{aA}	57,50±7,07 ^b	52,50±16,11 ^{bA}
Grupo A2	Com Plasma	47,71±13,36 ^{ab}	35,83±11,65 ^{ab}	15,83±30,17 ^{bb2}
	Sem Plasma	68,75±5,62 ^A	62,50±7,51 ^A	66,25±8,44 ^A

Letras minúsculas: comparação entre tempos de conservação; Letras maiúsculas: comparação entre tratamentos no mesmo grupo; Números: comparação entre grupos. ($p < 0,05$).

A adição de plasma seminal diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a motilidade espermática em ambos os grupos, em praticamente todos os tempos de conservação. Entretanto observou-se que as amostras sem adição de plasma seminal apresentaram melhor motilidade ao longo do tempo de conservação (comparação entre tratamentos no mesmo grupo). No grupo com concentração de frutose maior que 650 mg/dL no plasma seminal, observou-se melhor motilidade após 24 h de conservação, quando comparado ao grupo com concentração de frutose menor que 540 mg/dL. Aguiar (2008) constatou que a adição de plasma seminal caprino aos espermatozoides da cauda do epidídimo resfriados a 5 °C promoveu efeito deletério sobre a qualidade espermática a partir de 12 horas de conservação. Resultados semelhantes também foram encontrados em ovinos e bovinos (GRAHAM, 1994; GOOAVERTS et al., 2006).

Para o vigor foi observado um efeito significativo da interação entre o tratamento e o tempo (Tabela 9). De modo semelhante, a adição de plasma seminal afetou negativamente o vigor espermático em todos os tempos de conservação. Observou-se ainda a existência de interação significativa entre grupo e tratamento (Tabela 10). Visto que, a adição de plasma seminal diminuiu o vigor espermático, especialmente após a adição de plasma seminal aos espermatozoides da cauda do epidídimo do grupo A2.

Tabela 9. Medias e desvio-padrão do vigor de espermatozoides da cauda do epidídimo tratados com e sem plasma seminal em diferentes tempos de conservação.

Tratamento	Tempo de conservação		
	T0	T2	T24
Com Plasma	2,01±0,46 ^{ab}	1,88±0,56 ^{ab}	1,05±1,10 ^{bb}
Sem Plasma	3,13±0,34 ^{aA}	2,41±0,46 ^{bA}	2,54±0,67 ^{bA}

Letras minúsculas: comparação entre tempos de conservação no mesmo tratamento; Letras maiúsculas: comparação entre tratamentos no mesmo tempo de conservação. (p<0,05).

Tabela 10. Medias e desvio-padrão do vigor de espermatozoide da cauda do epidídimo dos grupos A1 e A2 tratados com e sem plasma seminal.

Grupo	Tratamento	
	Com Plasma	Sem Plasma
Grupo A1	1,88±0,73 ^{bA}	2,58±0,70 ^a
Grupo A2	1,43±0,94 ^{bB}	2,81±0,44 ^a

Letras minúsculas: comparação entre tratamentos no mesmo grupo; Letras maiúsculas: comparação entre grupos no mesmo tratamento. (p>0,05).

A frutose tem se mostrado um bom parâmetro para a seleção de reprodutores, uma vez que a mesma é importante para o metabolismo espermático. Além disso, a frutose está relacionada com as características de vigor e motilidade dos espermatozoides (MANN, 1954). Os resultados deste trabalho sugeriram uma boa capacidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo caprinos em utilizar o açúcar disponível no diluidor e no plasma seminal. Tais resultados também demonstraram que o aporte energético do plasma seminal deve ser considerado para a obtenção de bons resultados de conservação. Todavia, na espécie caprina não há relatos de como os espermatozoides utilizam a frutose no metabolismo energético, os poucos dados existentes são apenas informativos sobre a concentração deste monossacarídeo no plasma seminal (BARAKAT et al., 1972; MENDONZA et al., 1989; ROCA et al., 1993; PINHEIRO et al., 1996; RODRIGUES, 1997; CATUNDA, 2007).

Efeito significativo de grupo foi encontrado, também para o número de espermatozoide da cauda do epidídimo com DEMA (p<0,05). Os melhores resultados foram encontrados no grupo A2 (4,39±3,55) em detrimento do grupo A1 (8,19±5,27).

Apesar de constatada essa diferença, o número de espermatozoide da cauda do epidídimo com alterações morfológicas não comprometeria a capacidade fertilizante *in vivo*.

O agrupamento dos animais de acordo com a intensidade da atividade da FLA₂ não permitiu identificar interações com o tratamento, diluidor e tempo de conservação. Diante do exposto nenhum resultado importante foi constatado.

No tocante as proteínas totais presentes no plasma seminal constatou-se o efeito significativo de grupo ($p < 0,05$), apenas sobre a motilidade, o grupo B2, com menor concentração de proteínas totais (4,0 g/dL) apresentou melhor resultado ($54,76 \pm 20,60$) em comparação ao grupo B1, com maior concentração de proteínas totais (4,3 g/dL) ($47,73 \pm 21,91$). Foram testadas ainda as interações da concentração de proteínas totais com os outros fatores estudados, contudo não foram significativas.

Após o agrupamento das variáveis em função da concentração de cloretos no plasma seminal, constatou-se a existência de interação significativa ($p < 0,05$) entre grupo e tratamento para a ocorrência de DEMA (tabela 11).

Tabela 11. Medias e desvio-padrão de espermatozoide da cauda do epidídimo com DEMA dos grupos D1 e D2 submetidos ao tratamento com e sem plasma seminal.

Grupo	Tratamento	
	Com Plasma	Sem Plasma
Grupo D1	$8,14 \pm 6,36^A$	$6,77 \pm 4,22$
Grupo D2	$3,05 \pm 2,36^{bB}$	$5,94 \pm 3,40^a$

Letras minúsculas: comparação entre tratamentos no mesmo grupo; Letras maiúsculas: comparação entre grupos no mesmo tratamento, ($p < 0,05$).

A maior incidência de DEMA foi observada no grupo D1, onde houve adição de plasma seminal ($p < 0,05$). No grupo D2, a adição de plasma seminal diminuiu significativamente a incidência desses defeitos. Resultados semelhantes foram observados nesse experimento com os espermatozoides ejaculados, porém com os DEME.

A concentração de potássio no plasma seminal influenciou significativamente ($p < 0,05$) o vigor dos espermatozoides da cauda do epidídimo, de forma que no grupo E1 ($2,31 \pm 0,87$) foram encontrados melhores resultados que no grupo E2 ($1,95 \pm 0,92$). Estes resultados diferiram do observado anteriormente com espermatozoides do ejaculado, sugerindo a existência de um metabolismo diferenciado entre as categorias de espermatozoides.

5.4. Comparação entre os parâmetros seminais dos espermatozoides da cauda do epidídimo e do ejaculado

Quando o ejaculado foi lavado, removeu-se a ação danosa do plasma seminal e este foi comparado com os espermatozoides da cauda do epidídimo sem adição do plasma seminal (Tabelas 12 e 13). Esta comparação permitiu verificar que, o vigor e a motilidade foram similares nas duas categorias espermáticas, exceto, após a conservação por 24 horas, onde os valores foram melhores nos espermatozoides da cauda do epidídimo. Estudos anteriores demonstraram que essas categorias espermáticas apresentam vias metabólicas diferentes para obtenção de energia. Originalmente o metabolismo dos espermatozoides da cauda do epidídimo é essencialmente β -oxidativo utilizando-se preferencialmente de ácidos graxos de cadeia longa por ação intermediária da L-carnitina para produção de energia (NG et al., 2004). Supõe-se que essa diferença no vigor e na motilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo com 24 horas de conservação, possa ser atribuída a maior resistência das células do epidídimo ao choque térmico (WHITE e WALES, 1961).

Já a comparação entre as duas categorias espermáticas (ejaculado x espermatozoide da cauda do epidídimo) na presença de plasma seminal mostrou que os espermatozoides do ejaculado suportaram melhor o resfriamento a 5°C (Tabelas 12 e 13). Entretanto, White e Wales (1961) afirmaram que os espermatozoides da cauda do epidídimo são menos susceptíveis aos efeitos da diluição. Além disso, Nunes (1982) sugeriu que o plasma seminal é capaz de eliminar espermatozoides, pois parte das secreções das glândulas acessórias provoca extensiva morte celular nessa categoria espermática.

No tocante ao tratamento, os resultados demonstraram que a remoção do plasma seminal do ejaculado não alterou a qualidade espermática durante o período de conservação do sêmen de animais SPRD. Estes resultados foram diferentes dos encontrados por Roy (1957), Corteel (1974), Nunes (1982) e Campos et al. (2004). Porém foram similares aos obtidos por Ferrari e Barnabe (1999) em experimento com caprinos das raças Alpina, Saanen, Toggenbrugg e Anglonubiana, quando o sêmen foi submetido ao processo de congelamento.

Em se tratando dos espermatozoides da cauda do epidídimo, a adição de plasma seminal reduziu significativamente o vigor e a motilidade dessas células. Estudos recentes afirmaram que as células epididimárias são abruptamente afetadas pelo plasma seminal durante a ejaculação (YAMASHIRO et al., 2006).

Tabela 12. Médias e desvio-padrão da motilidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo e ejaculados de caprinos com e sem plasma e lavado e não lavado conservados a 5 °C por 0, 2 e 24 horas.

Tempo de Conservação	Motilidade			
	Ejaculado		Epididimário	
	Lavado	Não lavado	Com adição plasma seminal	Sem adição plasma seminal
0 h	63,02±12,41 ¹	71,98±6,84 ^{1A}	52,08±14,39 ^{1bB}	72,55±7,17 ^a
2 h	55,10±13,65 ^{1,2}	58,96±18,04 ²	43,33±14,84 ^{1b}	60,00±7,50 ^a
24 h	45,62±25,46 ^{2,B}	50,10±17,49 ^{2A}	25,42±26,69 ^{2bB}	59,37±14,31 ^{aA}

Letras maiúsculas: comparação entre ejaculado lavado x espermatozoide da cauda do epidídimo sem adição de plasma seminal e ejaculado não lavado x espermatozoide da cauda do epidídimo com adição de plasma seminal (p<0,05); Letras minúsculas: comparação entre tratamentos da mesma categoria espermática (p<0,05); Números comparação entre tempos de conservação (p<0,05).

Tabela 13. Médias e desvio-padrão do vigor dos espermatozoides da cauda do epidídimo e ejaculados de caprinos com e sem plasma e lavado e não lavado conservados a 5 °C por 0, 2 e 24 horas.

Tempo de Conservação	Vigor			
	Ejaculado		Epididimário	
	Lavado	Não lavado	Com adição plasma seminal	Sem adição plasma seminal
0 h	2,71±0,59 ¹	3,06±0,30 ^{1A}	2,04±0,46 ^{1bB}	3,13±0,34 ^{1a}
2 h	2,28±0,77 ¹²	2,38±0,73 ^{2A}	1,88±0,56 ^{1bB}	2,41±0,46 ^{2a}
24 h	1,93±1,09 ^{2B}	2,23±0,64 ^{2A}	1,05±1,10 ^{2bB}	2,54±0,67 ^{2aA}

Letras maiúsculas: comparação entre ejaculado lavado x espermatozoide da cauda do epidídimo sem adição de plasma seminal e ejaculado não lavado x espermatozoide da cauda do epidídimo com adição de plasma seminal (p<0,05); Letras minúsculas: comparação entre tratamentos da mesma categoria espermática (p<0,05); Números comparação entre tempos de conservação (p<0,05).

Diversos fatores podem ter influenciado negativamente os espermatozoides que tiveram contato com plasma seminal dentre eles a presença da FLA₂ existente nessa secreção, que em contato com a lecitina presente na gema de ovo contida no diluidor, resultou em lisolecitina e ácidos graxos, que exercem efeito deletério sobre a viabilidade

dos espermatozoides. Confirmando assim o que estudos anteriores já haviam relatado, isto é, que o plasma seminal de caprinos tem efeito deletério a viabilidade espermática, sendo estes provenientes do ejaculado ou da cauda do epidídimo (ROY, 1957; CORTEEL, 1974; NUNES, 1982; CAMPOS et al., 2004; SIAS et al., 2005; AGUIAR, 2008).

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que, independente do diluidor utilizado, os parâmetros seminais tendem a cair e os defeitos morfológicos a aumentar conforme o tempo de conservação se prolonga. No entanto, quando os espermatozoides ejaculados foram lavados, a morfologia espermática foi favorecida e diante deste fato, recomenda-se a lavagem do sêmen antes da conservação, visto que, este procedimento diminuiu a ocorrência de espermatozoide com defeitos maiores.

A adição de plasma seminal aos espermatozoides da cauda do epidídimo confirmou o efeito deletério, que foi refletida na diminuição da motilidade e vigor e no aumento no número de células com defeitos maiores.

Comparando-se as duas populações espermáticas, o efeito deletério do plasma seminal sobre o resfriamento das células espermáticas do ejaculado foi mais evidente sobre os espermatozoides da cauda do epidídimo.

Este estudo sugere que alguns constituintes presentes no plasma seminal, quando em alta ou baixa concentração, podem ser utilizados como critério indicativo da qualidade e da viabilidade do sêmen resfriado a 5°C por até 24h. Todavia, este estudo necessita ser conduzido com animais ainda não adaptados às condições climáticas do Nordeste brasileiro, como Anglo Nubiano, Saanen e Boer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, 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*, v. 38, p. 45-49, 2000.

AGUIAR, G. V. Efeito individual e da época do ano sobre a composição do plasma seminal e a qualidade do sêmen caprino resfriado a 4° C por 48 horas no litoral do estado do Ceará. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, 85p, 2008.

AMANN R, P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: Morrow DA. *Current therapy in theriogenology*. 2.ed., p.532-538, 1986.

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*, 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*, v. 46, p. 791-797, 1996.

BARAKAT, M. Z.; ABDALLA, A.; HASSANEIN, R. R. Evaluation of fructose content of buck semen. *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences Biologiques*, v. 20, n. 6, p. 361 – 363, 1972.

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*, v.63, p. 1531-1537. 2000.

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

BLACKSHAW, A.W. Effects of potassium and calcium salts on the motility of ram, rabbit and bull spermatozoa. *Journal of Physiology*, v. 120, n. 4, p. 465 – 470, 1953.

BLACKSHAW, A.W.; SALISBURY, G.W. factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. *Journal Dairy Science*, v. 40, p. 1099 – 1106, 1957.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk veterinary medicin*. v. 25, n. 7, p. 383- 391, 1973.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, v. 52, p.863-873, 1999.

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 Animal*. 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*, v. 29, p. 411-426, 1994.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; PINHEIRO, J.H.T.; FERREIRA, M.A.L; ARAÚJO, A.A.; 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*, v. 27, n. 4, p. 620-624, 2003.

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*, v.11, p.178- 182, 2004.

CATUNDA, A.G.V. Composição bioquímica do plasma seminal de caprinos sem padrão racial definido (SPRD) em clima tropical úmido. *Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará*, 39p, 2007.

CATUNDA A.G.V., CAMPOS A.C.N., PEREIRA-ROCHA J.F., LIMA Í.C.S., ARAÚJO A.A., MARTINS G.A. Monthly variation in concentration of macroelements in the goat

seminal plasma in humid tropical climate. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n. 4, p. 1177-1185. 2009.

CATUNDA A.G.V., LIMA I.C.S., PEREIRA-ROCHA J.F., PITOMBEIRA R.S.S., VITALIANO A.B., SILVA M.M., AGUIAR G.V., GADELHA C.R.F., ARAUJO A.A., MARTINS G.A., CAMPOS A.C.N. Plasma of Goats Raised under Tropical Climates in Northeastern Brazil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* (no prelo). 2012

ÇEVK, M.; TUNCER, P. B.; TAŞDEMİR, U.; ÖZGÜRTAŞ, T.. Comparison of Spermatological Characteristics and Biochemical Seminal Plasma Parameters of Normozoospermic and Oligoasthenozoospermic Bulls of Two Breeds. *Journal. Veterinary. Animal. Science.*; vol.: 31, nº: 6: p.:381-387, 2007.

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

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

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

CHOE, C.; KIM J.; CHO, S.; SON, D.; KIM, Y.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S.; RHO G. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. *Reproduction Domestic Animal*, v. 41, p. 55–60, 2006.

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

COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. East school agriculture science university of northingans, *Anais*. p.: 453-465, 1983.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal. Effect du glucose. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique, 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, v. 20, n. 4, p. 1111-1123, 1980.

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, v. 59, p. 1093 – 1107, 2003a.

DE PAUW, I.M.C.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; VERBERCKMOES, S. KRUIF, A. effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of in vitro storage bovine spermatozoa. Theriogenology, v. 59, p. 1109 – 1122, 2003b.

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.

DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. Theriogenology, v. 68, p. 168-177, 2007.

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

EHLERS, M.H.; DIXON, J.; ERB, R. E. Acid-soluble phosphorus constituents of bull semen in relation to fructolysis and to sperm concentration. Journal of Dairy Science, v. 44, n. 9, p. 1679 – 1687, 1961.

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

ERB, R.E.; FLERCHINGER, M.H.; EHLERS, M. H.; GASSNER, F.X. Metabolism of bull semen. II. Fructolysis relationships with sperm concentration and fertility. Journal of Dairy Science, v. 39, n. 3, p. 326 – 338, 1956.

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

FARSTAD, W. Cryopreservation in semen dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 251 – 260, 1996.

FERRARI, S.; BARNABE, V.H. Effect of two kinds of diluents and two freezing methods on caprine semen quality. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v.36, p.1-4, 1999.

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*, v.23, n.6, p. 518-524, 1986.

FLIPLASMA SEMINALE, J. R.; ANDERSON, R. W. Metabolism of Bovine Semen. XIX. Products of Fructose Metabolism by Washed Spermatozoa, *Journal of Dairy Science*, v. 52, n. 7, p. 1070-1073, 1969.

FREUND, M.; MURPHREE, R. L. Influence of sperm concentration, inicial fructose level, and inicial per cent motility on the fructolytic activity of bovine semen. *Journal Dairy Science*, v. 42, n. 8, p. 1320 – 1324, 1959.

GATTI J.; DRUART X.; SYNTIN P.; ERIN G. Y.; DACHEUX J.; DACHEUX F. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 950–958, 2000.

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*, 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 plasma seminal ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a +37°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 8, n. 3, p. 174-178, 1984.

GOOVAERTS, I. G.; HOFACK, G. G.; SOON, V. A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; KRUIF, D. A.; BOLS, E. P. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-

Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GRAHAM K. J. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, v. 41, n. 5, p. 1151-1162, 1994.

HAAS, G. H. DE; POSTEMA, N.M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DESPERMATOZOIDE DA CAUDA DO EPIDÍDIMONEN, L.L.M. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.:159, p.:103-117, 1968.

HALANGK, W.; TUGER, U.; BOCHNENSACK, R. Quantification of aerobic energy turnover in epididymal bull spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1015, p. 243-247, 1990.

HARRISON, R .A. P. Glycolytic enzymes in mammalian spermatozoa: activities and stabilities of hexokinase and phosphofructokinase in various fractions from sperm homogenates. *Biochemistry Journal*, v. 124, n. 4, p. 741-750, 1971.

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

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*, 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*, v. 71, n. 6, p. 1138 – 1143, 1999.

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; BOONE, W.R.; GRAY, S.L.L. Identification of insulin-like growth factor-I in bovine plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 330-337, 1998.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal of Reproduction Science*, v. 62, p. 3-22, 2000a.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000b.

ISLAM, L.; AHMED, K.; DEKA, B.C. Effect of holding and washing on the quality of goat semen. *Small Ruminant Research*, v. 66, n° 1-3, p. 51-57, 2005.

JAISWAL, B.S.; CONTI, M. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 100, p. 10676–10681, 2003.

JAN MARTAN. Epididymal Histochemistry and Physiology. *Biology of Reproduction*, v. 1, p. 134-154, 1969.

JOHNSTON S.D.; KUSTRITZ M. V. R.; OSLOM P. N. S. Semen collection, evaluation and preservation. *In: Johnston SD, Kustritz MVR, Oslon PNS. Canine and feline theriogenology*, p. 287-306, 2001.

JONAKOVA V.; SKOVA M. P.; KRAUS M.; LIBERDA J.; TICHA M.. Sperm Surface Proteins in Mammalian Fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, v. 56, p. 275–277, 2000.

JONAKOVA, V.; MANASKOVA P.; TICHA, M. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 849, p. 307-314, 2007.

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*, 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*. v.65, n. 6, p. 1171-1179, 2006.

KVIST, U. Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin descondensation ability in man. *Acta Physiology Scandinavan*, 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*. v. 57, p. 1035-1048, 2002.

LASLEY F. J.; BOGART R. A Comparative Study of Epididymal and Ejaculated Spermatozoa of the Boar. *Journal of Animal Science*, v. 3, p. 360-370, 1944.

LEBOUEF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production et conservation de la semece de bouc pour l'insémination artificielle. *INRA Productions Animales, Castanet-Tolosan*, v. 16, p. 91-99, 2003.

LEE Y. H.; BAHN C.S.; KANG Y.; LEE H. K.; KIM J. H.; NOH K. E.; JIWAN P.; SHIN J. S.; RYU B. S. Secretory low molecular weight phospholipase A₂ plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in arabidoplasma seminalis. *The Plant Cell*, v. 15, p. 1990–2002, 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*. v. 11, n. 11, p. 2465-2467, 1996.

LIMA, Í. C. S.; CATUNDA, A. G. V.; PEREIRA, J. F.; ANDRADE, I. R. A.de; MONTEIRO, A. W. U.; CAMPOS, A. C. N.; ARAÚJO, A. A.de . Determinação do volume do ejaculado e plasma seminal de caprinos sem padrão racial definido (sprd) durante a época seca no estado de ceará. In: *ZOOTEC 2006 - 22 a 26 de maio de 2006 - Centro de Convenções de Pernambuco, 2006, Recife. 40 anos de ensino em Zootecnia no Brasil, 2006.*

LODGE, J.R.; SALISBURY, G.W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. VI. Metabolic CO₂ and fructose. *Journal Dairy Science*. v. 43, n. 2, p. 140 – 144, 1963.

LU, J-C.; CHEN, F.; XU, H-R.; HUANG, Y-F.; LU, N-Q. Standardization and quality control for determination of fructose in seminal plasma. *Journal of Andrology*, v. 28, n. 2, 2007.

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

MANN, T. The Biochemistry of Semen. John Wiley & Sons, New York; Methuen & Company, 240p, 1954.

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

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. v. 40, n. 4, p. 481 – 491, 1946.

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

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

MATOS- BRITO, G. B. Viabilidade do Sêmen Caprino conservado em três diferentes diluidores: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal. 2007, 61f., enc. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, 2008.

MATOS-BRITO, B. G.; LIMA, Í. C. S.; PEREIRA, J. F.; BARBOZA, F. M. ; Linard, M. A. B. ; AGUIAR, G. V.; CATUNDA, A. G. V.; MOURA, A. A. de A.; NUNES, J. F.; CAMPOS, A. C. N. . Effect of initial seminal plasma fructose concentration on goat semen storage at 5°C. Archivos de Zootecnia, 2012.

MAYES P.A., BENDER D.A. Glycolysis and the oxidation of pyruvate. In: Harper's Illustrated Biochemistry, 26^a edição. Editores: MURRAY R.K., GRANNER D.K., MAYES P.A., RODWELL V.W. The McGraw-Hill, 136-144, 2003.

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

MENDOZA. G.; WHITE, I.G.; CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. Theriogenology. v. 32, n. 3, p. 455-466, 1989.

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

MCPHAIL B. D.; GOODMAN A. B. Tris buffer-a case for caution in its use in copper-containing systems. *Biochemical Journal*, v. 221, p. 559-560, 1984.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1487, p. 24-32, 2000.

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*, v. 111, p. 81-89, 1997.

NG, C. M.; BLACKMAN, M. R.; WANG, C.; SWERDLOFF, R. S. The role of carnitine in the male reproductive system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1033, p. 177-188, 2004.

NRC - Nutrient requirements of goats. Washington, D. C.: National Academy Press, Washington, 91p, 1981.

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

O'SHEA T.; WALES R.G. Metabolism of sorbitol and fructose by ram spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*. Vol.:10, p.:353-368. 1965.

O'SHEA, T; VOGLMAYR, J.K. Metabolism of glucose, lactate, and acetate by testicular and ejaculated spermatozoa of the ram. *Biology of Reproduction*.v. 2, n. 2, p. 326 – 332, 1970.

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*, v. 9, p. 81-390, 1997.

PEREZ LLANO, B.; MATEOS REX, E. Efecto del tipo de crioprotector 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.

PÉREZ-PÉ, R.; CÉBRIAN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.56, p.425-434, 2001.

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, Fortaleza, p. 419-421, 1996b.

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

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*, v. 35, p. 305-312, 1982.

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*, 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*, 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 stored at 5°C. *Small Ruminant Research*, v. 225, p. 147 – 153, 1997.

RODRIGUES, L.F.S. Efeito do método de colheita sobre os aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de caprinos mestiços e ovinos deslanados da raça Santa Inês

criados no Estado do Ceará. 1997. 87f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 1997.

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

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

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

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

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

SANCHEZ-LUENGO, S.; LLER, A. G.; ALBRECHT M.; SEN C. P.; ROHM K.; WILHELM, B. Interaction of PDC-109, the Major Secretory Protein From Bull Seminal Vesicles, With Bovine Sperm Membrane Ca²⁺-ATPase. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 2, 2004.

SAS, User's guide: statistics – version 6. ed. Cary, Statistical Analysis System Institute, 2000.

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*. p. 169-180, 2005.

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

THAKKER, J.K.; EAST, J.; SEYLER, D.; FRANSON, R.C. Surface active FLA2 in mouse spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*. n. 754, p. 44–50, 1983.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Stimulate Phospholipid Efflux from Epididymal Sperm. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 590-598, 1999.

TULI, R.K.; HOLTS, W. Effects of season on the frespermatozoide da cauda do epidídimoizability of boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology*, v. 43, p. 1359 – 1363, 1995.

UPRETI G. C.; HALL E. L.; KOPPENS D.; OLIVIER J. E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (FLA2) and FLA2 inhibitor activities in ram semen. *Animal Reproduction Science*, n.56, p.107-21, 1999.

VAN DOP, C.; HUTSON, M. S.; LARDY, A. H. Pyruvate Metabolism in Bovine Epididymal Spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, n. 4, p. 1303-1309, 1977.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 39-48, 2003.

WALES, R.G.; WHITE, I.G. The effect of the ions of the alkali metals magnesium and calcium on dog spermatozoa. *Journal of Physiology*, v. 142, n. 3, p. 494 – 502, 1958.

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*, v. 28, n. 2, p. 145-152, 1975.

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*, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

WHITE G.; WALES G. R. Comparison of epididymal and ejaculated semen of the ram. *Journal Reproduction Fertility*, n. 2, p. 225-237, 1961.

WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre, 2009.

YAMASHIRO, H.; KUMAMOTO, K.; WANG, H.; YAMASHITA, Y.; TERADA, T. Effect of semen collection in extender solution on the characteristics of goat spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, n. 3, p. 397 – 406, 2006.