



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

**EFEITO DA ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL E DE SUA
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA SOBRE OS ESPERMATOZÓIDES
EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS**

KATIANE QUEIROZ DA SILVA

FORTALEZA – CEARÁ

2009

KATIANE QUEIROZ DA SILVA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL E DE SUA
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA SOBRE OS ESPERMATOZÓIDES
EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS**

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 2009

KATIANE QUEIROZ DA SILVA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL E DE SUA
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA SOBRE OS ESPERMATOZÓIDES
EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS**

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 06/08/2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos
ORIENTADORA

Profa. Dra. Emmanuelle Lima de Figueirêdo
CO-ORIENTADORA (INTA)

Prof. Dr. Arlindo Alencar Noronha Araripe Moura
EXAMINADOR - UFC

S580e Silva, Katiane Queiroz da
Efeito da adição de plasma seminal e de sua composição bioquímica sobre os espermatozoides epididimarios de caprinos / Katiane Queiroz da Silva, 2009.
57f. ; il. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos
Co-orientadora: Profa. Dra. Emmanuelle Lima de Figueirêdo
Área de concentração: Manejo Reprodutivo
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Depto. de Zootecnia, Fortaleza, 2009.

1. Caprino 2. Espermatozóide epididimario 3. Fosfolipase A₂
4. Frutose e proteínas totais I. Campos, Ana Cláudia Nascimento (orient.)
II. Figueirêdo, Emmanuelle Lima de (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Zootecnia IV. Título

CDD 636.08

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Islânia Castro CRB-0/111

***D**EDICO este trabalho aos meus pais **José Gonzaga** e **Socorro** pelo amor incondicional dedicado a mim. A vocês todos o meu amor.
Para o grande homem **José Gonzaga**, uma grande obra.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, coragem, conformação, conforto, amor e sabedoria que me foram dadas para enfrentar os momentos mais difíceis, superar aprovações e continuar seguindo meu caminho rumo à conclusão deste curso.

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 José Gonzaga (*in memorian*), por todo amor, incentivo, dedicação e apoio ofertados a mim até seus últimos dias de vida.

À minha mãe Socorro Queiroz, por ser além de mãe um exemplo de vida.

Aos meus irmãos Kátida Daniella e Leandro pelo incentivo e por substituírem a minha ausência junto aos meus pais durante os momentos mais difíceis desta jornada.

A minha avó Rosa Vieira de Queiroz, pela força, carinho, oração e compreensão oferecidos a mim em todos os momentos.

Às minhas tias Rita (*in memorian*) e Lucirene Holanda (*in memorian*) pela confiança, admiração e amor que dedicaram a mim até o fim de suas vidas.

Aos meus demais familiares por estarem ao meu lado apoiando a realização dos meus sonhos.

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

Aos alunos de graduação e pós-graduação que ajudaram na condução dos trabalhos dentre eles: Jeane, Rafael, Andrea, Ítalo, Gabriel, Marco Antônio, Emanuel, Airton, Fabiano e Gyselle Aguiar. Meu muito obrigada.

Às minhas amigas Ana Gláudia e Fátima Révia pelo apoio, conselhos, ensinamentos, compreensão, ajuda e pelos momentos de descontração que fizeram os meus dias ficarem mais agradáveis.

Aos meus amigos-irmãos, que durante muitos anos me incentivaram de todas as maneiras a conseguir meus objetivos: Clébia Martins, Daniele Almeida, Josimeire Batista, Márcia Cavalcanti, Meire Batista, Valéria Sousa e Wigor Florêncio.

A toda equipe da Comissão Coordenadora de Concursos e Vestibulares (CCV-UFC) pela confiança, incentivo e apoio oferecidos a mim durante todos estes anos.

Principalmente a Mônica Feitosa e a Professora Maria de Jesus Correia e Sá. Á vocês meu muito obrigada.

Agradeço também a todos aqueles que de uma forma ou de outra me ajudaram.

MUITO OBRIGADA

“SENHOR, tu me sondaste, e me conheces. Tu sabes o meu assentar e o meu levantar; de longe entendes o meu pensamento e o meu coração. Cercas o meu andar, e o meu deitar; e conheces todos os meus caminhos. Tal ciência é para mim maravilhosa; tão alta que não a posso atingir. Eu te louvarei, porque de um modo assombroso, e tão maravilhoso fui feito; maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem. SENHOR, eu sei que tu me amas”

SALMO 139

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | XI |
| ABSTRACT | XII |
| LISTA DE QUADROS E TABELAS | XIII |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1. ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS..... | 2 |
| 2.2. PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO PLASMA SEMINAL E SUA AÇÃO SOBRE OS ESPERMATOZÓIDES DURANTE A EJACULAÇÃO | 3 |
| 2.2.1. FRUTOSE NO PLASMA SEMINAL E O METABOLISMO ENERGÉTICO NA CÉLULA ESPERMÁTICA | 4 |
| 2.2.2. FOSFOLIPASE A ₂ DO PLASMA SEMINAL E SUA AÇÃO NO METABOLISMO ESPERMÁTICO..... | 6 |
| 2.2.3. AS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO ESPERMÁTICO..... | 7 |
| 2.3. DILUIDORES | 8 |
| 2.3.1. TRIS-GEMA (TG) | 8 |
| 2.3.2. CITRATO-GEMA (CG) | 9 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 11 |
| 4. HIPÓTESE | 12 |
| 5. OBJETIVO | 13 |
| 5.1. GERAL | 13 |
| 5.2. ESPECÍFICO | 13 |
| 6. MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 6.1. LOCAL DO EXPERIMENTO..... | 14 |
| 6.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS..... | 14 |
| 6.3. COLETA DO PLASMA SEMINAL..... | 14 |
| 6.4. CASTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS..... | 15 |
| 6.5. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL..... | 15 |
| 6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 17 |

| | |
|--|----|
| 7. RESULTADOS | 18 |
| 7.1. RESULTADOS GERAIS SOBRE OS PARÂMETROS SEMINAIS | 18 |
| 7.2. EFEITO ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE A ₂ (FLA ₂) PRESENTE NO PS SOBRE OS PARÂMETROS DOS ESPERMATOZÓIDES DE CAPRINOS | 20 |
| 7.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE DO PLASMA SEMINAL SOBRE OS PARÂMETROS DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS | 23 |
| 7.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO PLASMA SEMINAL SOBRE OS PARÂMETROS DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS | 23 |
| 8. DISCUSSÃO | 25 |
| 9. CONCLUSÃO | 32 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da adição e da composição do plasma seminal (PS) sobre as características dos espermatozóides epididimários (EEP) de caprinos. Utilizaram-se oito machos caprinos para obtenção do PS, que foi obtido em coletas prévias e armazenado a -18°C até que se procedessem a sua adição aos EEP e as análises bioquímicas. Os EEP foram obtidos da cauda do epidídimo pelo método de castração cirúrgica. Do “pool” de EEP foram retiradas quatro alíquotas de $100\ \mu\text{L}$, sendo que em duas delas foram adicionados $120\ \mu\text{L}$ de PS e nas outras duas não. Duas alíquotas, uma com e outra sem PS, foram diluídas a uma concentração de 200×10^6 spz/ mL, no diluidor citrato-gema (CG) e no diluidor tris-gema (TG). As amostras foram avaliadas quanto ao vigor, à motilidade e à taxa de degradação da motilidade (TDM) no seu estado fresco e pelo teste de termorresistência lento, após duas e 24 horas de conservação. Para a determinação dos níveis de frutose e de proteínas totais foram utilizados os kits específicos da *In Vitro* Diagnóstico S/A[®]. A determinação da atividade da fosfolipase A_2 foi realizada pela técnica do pH-stat. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SAS[®]. Os resultados demonstraram que a adição de PS aos EEP diminuiu significativamente os parâmetros seminais avaliados, exceto no diluidor TG quando os animais foram agrupados em função da concentração de proteínas totais do PS. Além disso, o TG, quando utilizado para conservar os EEP adicionados de PS de baixa concentração de frutose ($540\ \text{mg/dL}$) preservou melhor as características seminais avaliadas. Concluiu-se que a concentração inicial de frutose no PS influenciou positivamente a qualidade de conservação dos espermatozóides epididimários; já a de proteínas totais afetou apenas a conservação no CG e a intensidade de atividade da fosfolipase A_2 não interferiu na conservação a $5\ ^{\circ}\text{C}$ dos espermatozóides epididimários de caprinos.

Palavras-chave: caprino, espermatozóide epididimário, fosfolipase A_2 , frutose e proteínas totais.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the effect of the addition and of the composition of the seminal plasma (SP) on the characteristics of the epididymal spermatozoa (ES) of goat. Eight goat males were used for obtaining of the biological material so that, the SP it was obtained in previous collections and stored at -18 °C until that proceeded to the addition to ES and the biochemical analyses. ES were obtained of the tail of the epididymal by the method of surgical castration. Four sample of 100 µL were removed from the "pool" of ES, and in two of them 120 µL were added of SP. Two sample, one with and other without SP, were diluted in a concentration of 200×10^6 spz / mL, in the extender citrate-yolk (CY) and in the extender tris-yolk (TY). The samples were evaluated the vigor, motility and motility degradation rate (TDM) in fresh state and for the test of slow thermoresistence, after two and 24 hours of conservation. For the determination of fructose levels and total proteins were used specific kits of *In Vitro* Diagnóstico S/A®. The determination of activity of the phospholipase A₂ was realized by the technique of the pH-stat. For the analysis of the data was used the statistical program SAS®. The results demonstrated that the addition of SP to ES reduced seminal parameters significantly, except in the extender TY when the animals were to grouped in function of concentration of total proteins of SP. Besides, the TY, when used to conserve the ES added of SP with low fructose concentration (540 mg/dL) preserved the seminal characteristics better. It follows that the initial concentration of fructose in the seminal plasma influenced the quality of conservation of the epididymal spermatozoa; as for the total proteins just affected the conservation in the citrate-yolk and the intensity of activity of the phospholipase A₂ did not interfere in the conservation at 5 °C of the epididymal spermatozoa of goat.

Keywords: goat, epididymal spermatozoa epididymal, phospholipase A₂, fructose and total proteins.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO DO DILUIDOR TRIS-GEMA (TG) PARA O SÊMEN CAPRINO | 09 |
| QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DO DILUIDOR CITRATO-GEMA (CG) PARA O SÊMEN CAPRINO..... | 10 |
| TABELA 1 – MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO DO VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS DILUÍDOS NOS TRIS-GEMA E CITRATO-GEMA CONSERVADOS A 5° C POR 0, 2 E 24 HORAS | 19 |
| TABELA 2 - MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO DA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DILUÍDOS NOS DILUIDORES TRIS-GEMA E CITRATO-GEMA CONSERVADOS A 5° C POR 0, 2 E 24 HORAS | 19 |
| TABELA 3 – MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO DA TAXA DE DEGRADAÇÃO DA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DILUÍDOS NOS DILUIDORES TRIS-GEMA E CITRATO-GEMA CONSERVADOS A 5° C POR 0, 2 E 24 HORAS..... | 19 |
| TABELA 4 – EFEITO DA ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE A ₂ DO PLASMA SEMINAL SOBRE O VIGOR E A MOTILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS | 20 |
| TABELA 5 – EFEITO DA ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE A ₂ DO PLASMA SEMINAL SOBRE A TDM DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS | 21 |
| TABELA 6 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE DO PLASMA SEMINAL SOBRE O VIGOR E A MOTILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS..... | 22 |
| TABELA 7 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE DO PLASMA SEMINAL SOBRE A TDM DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS..... | 22 |
| TABELA 8 - EFEITO CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO PLASMA SEMINAL SOBRE O VIGOR E A MOTILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS | 23 |
| TABELA 9 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO PLASMA SEMINAL SOBRE A TDM DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CAPRINOS | 24 |

1. INTRODUÇÃO

O epidídimo de mamíferos é dividido anatomicamente em três regiões distintas (cabeça, corpo e cauda) e as secreções produzidas pelo epidídimo são responsáveis por mudanças na estrutura do espermatozóide (JAN MARTAN, 1969). Pesquisas realizadas em numerosos mamíferos têm levado ao paradigma de que o epidídimo desempenha um importante papel na reprodução do macho devido ao transporte, maturação e armazenamento espermático (WHITE, 1973; JONES, 1999), pois os espermatozoides que deixam os testículos são incapazes de fertilizar o oócito, de forma que adquirirão esta potencialidade durante o trânsito epididimário (AMANN et al., 1993; MÜLLER et al., 1997; JAISWAL e MAJUMDER, 1998). Outros estudos têm demonstrado que o trânsito epididimário e a ejaculação são etapas cruciais na maturação e viabilidade espermática de mamíferos (MÜLLER et al., 1997) e que o gameta masculino está sob contínuo processo de modificação (THIBAUT e LEVASSEUR, 1991; AMANN et al., 1993).

No que se refere ao PS, diversas pesquisas demonstraram que este contém uma variedade de constituintes que participam do metabolismo espermático como: a frutose, fornecendo energia ao espermatozóide (MANN, 1946), as proteínas específicas (CALVETE et al., 1994) e os minerais (KAYA et al., 2002), que modulam as funções espermáticas e a fosfolipase A₂, que em caprinos reduz a qualidade espermática (PELLICER-RUBIO et al., 1997).

Todavia, não há relatos na literatura se diferentes concentrações de frutose e de proteínas totais no PS de caprinos podem interferir na conservação dos espermatozoides, do mesmo modo que não existem relatos se a intensidade de atividade da fosfolipase A₂ encontrada no PS, em condições tropicais, pode interferir negativamente na conservação das células germinativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espermatozóides epididimários.

Os espermatozóides 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 e as glândulas sexuais acessórias 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 espermatozóides férteis. Além disso, a duração do trânsito epididimário varia com a espécie animal.

Os EEP 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 espermatozóides epididimários estão envolvidas diversas proteínas provenientes do fluido epididimal (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 epididimal 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.

Os EEP de bovinos metabolizam o piruvato através do ciclo do ácido cítrico (VAN DOP et al., 1977), de forma que em condições anaeróbicas os EEP produzem ATP via conversão do piruvato à lactato, por meio da oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ à NAD^+ . Além disso, a adição de frutose ao EEP re-estabeleceu a motilidade, entretanto a adição de lactato, acetato ou acetoacetato não foram eficazes para a motilidade (VAN DOP et al., 1977). Halangk et al. (1990) constataram que a taxa respiratória, a motilidade e o consumo de ATP dos EEP de bovinos foram mais baixos que dos espermatozóides ejaculados e que os substratos endógenos dos EEP são suficientes para este baixo metabolismo. Contudo,

para o aumento da atividade metabólica, os EEP necessitam de substratos exógenos tais como a frutose.

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

O plasma seminal é o produto das secreções das glândulas anexas do macho (próstata, vesícula seminal e glândula bulbo-uretral), epidídimo, ducto deferente e ampola dos ductos deferentes (EVANS e MAXWELL, 1990). Este é constituído de aminoácidos, peptídeos, proteínas, açúcares, ácido cítrico, minerais, fosfatases e prostaglandinas. O plasma seminal exerce papel essencial na reprodução, à medida que serve de nutriente para os espermatozóides, estimula o metabolismo espermático e transporta as células espermáticas até o trato genital feminino. Sobretudo, os constituintes do plasma seminal mantêm a motilidade espermática e a habilidade de alcançar, reconhecer e se ligar ao oócito (EVANS e MAXWELL, 1990; MAXWELL e JOHNSON, 2000). Segundo Guerra et al. (2004), o plasma seminal contém antioxidantes importantes para a preservação dos espermatozóides.

Hafez e Hafez (2000) constataram que o plasma seminal contém diversos íons tais como, sódio, potássio, cloreto, cálcio e magnésio. Estes autores relataram que o potássio está correlacionado com a viabilidade espermática e o cálcio regula a fisiologia do espermatozóide. Contudo, as glândulas vesiculares secretam açúcares como a glicose, ribose, sorbitol, inositol e frutose que atuam no metabolismo energético do espermatozóide (Hafez e Hafez, 2000). No tocante a isto, Catunda (2007) concluiu que existe influência da época do ano sobre a variação na composição bioquímica do plasma seminal de caprinos e tais variações se dão sobre o cálcio, fósforo, magnésio, proteínas totais, ácido cítrico e frutose.

A literatura mostra uma divergência no papel do plasma seminal sobre os espermatozóides. Uma vez que relatos sugerem que o plasma seminal contém fatores que influenciam benéficamente a fertilidade do macho (AURICH et al., 1996). Enquanto outros trabalhos sugerem que a presença do plasma seminal no meio de conservação interfere no comportamento dos espermatozóides em suportar a congelação, além de conter fatores que impedem a reação acrossômica e inibe a capacitação espermática nos processos de fertilização in vitro (CORTEEL, 1974; KATSKA et al., 1996).

2.2.1. Frutose do plasma seminal e o metabolismo energético na célula espermática.

Apesar do fato da célula espermática não dispor de um grande número de organelas envolvidas com os processos do metabolismo energético, a mesma possui 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 energeticamente o espermatozóide na forma de um material facilmente fermentável. Apesar disso, sabe-se que em aerobiose, a frutose não é a única fonte de energia para o espermatozóide, que mesmo privado de frutose, pode sobreviver na presença de O₂ devido à utilização de outras substâncias (MANN, 1946). Todavia, em condições anaeróbicas o espermatozóide depende amplamente da frutose, e a cessação da frutólise, invariavelmente termina sua atividade (MANN, 1946; LODGE e SALISBURY, 1963). Além disso, os espermatozóides utilizam a frutose pela via glicolítica convencional, como as outras células (FLIPSE e ANDERSON, 1969; HARRISON, 1971). Estudos tem mostrado que a habilidade do espermatozóide em utilizar igualmente a frutose, a glicose ou a manose deve-se ao fato destes três açúcares entrarem no ciclo da glicólise por meio da reação da hexoquinase com o ATP, seguida pela formação do monofosfato hexose até ácido láctico (MANN, 1945; MANN, 1946; KING et al., 2006). 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). Entretanto, não foi observada qualquer correlação entre a taxa de frutólise e a fertilidade, nem diferença entre a frutólise nos diferentes reprodutores bovinos (FREUND e MURPHREE, 1959), sugerindo que as diferenças na utilização de frutose podem ser atribuídas pelas diferenças na concentração espermática, no nível de frutose inicial e na motilidade espermática inicial. Outros autores, porém, sugerem que a mensuração da atividade frutolítica (glicólise anaeróbica) não é, provavelmente, um bom indicativo da taxa relativa do metabolismo espermático, desde que os resultados possam variar amplamente, dependendo das condições usadas (LODGE e SALISBURY, 1963).

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 sangüínea e outra que é consequência do metabolismo do sorbitol (MANN, 1974). Esta se constitui num componente seminal importante para o metabolismo do espermatozóide e seu nível reflete na qualidade espermática, na atividade metabólica e na função normal secretora da glândula vesicular (DHAMI 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 dos níveis de frutose e ácido cítrico no sêmen de caprinos.

Estudos têm mostrado que a adição de frutose é essencial ao espermatozóide 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 a adição de hexose ao diluidor diminuiu o consumo de O₂ pelas células espermáticas lavadas durante a primeira hora de incubação.

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

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

alimento ocorrida durante a época chuvosa. Em bovinos, também foi observado que o nível de frutose variou entre as raças (ERB et al., 1956). Os mesmos autores encontraram uma correlação negativa entre o nível de frutose e a taxa de não retorno de estro em vacas. Hiroe et al. (1960) afirmaram que a condição de armazenamento do plasma seminal, a frequência de ejaculações, o nível de glicose no sangue e a condição nutricional podem interferir fortemente na produção e metabolismo da frutose. Um estudo recente, afirmou que as amostras de plasma seminal congeladas a -20°C e depois descongeladas servem perfeitamente para determinação da frutose seminal. Além disso, a refrigeração é necessária para o estabelecimento do controle de qualidade para a determinação da frutose seminal (LU et al., 2007). Os mesmos autores observaram que a concentração de frutose diminuiu significativamente à medida que o tempo de centrifugação para a separação do plasma seminal do sêmen se prolongou de 0 a 4 h.

2.2.2. Fosfolipase A_2 do plasma seminal e sua ação no metabolismo espermático.

A fosfolipase A_2 (PLA_2) 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 (CHAMINEAU et al., 1999; LEE, 2003). Esta enzima tem sido encontrada no plasma seminal (RONKKO et al, 1992) e está envolvida na modificação de lipídeos na membrana espermática e faz parte do processo de maturação dos espermatozóides epididimários (RONKKO, 1992; UPPRETI et al., 1999).

No entanto, a fosfolipase A_2 no sêmen caprino catalisa a hidrólise de lecitinas em lisolecitinas produzindo ácidos graxos livres. As lisolecitinas, devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática e os ácidos graxos são considerados tóxicos aos espermatozóides. Além disso, a lecitina é o principal fosfolipídio da membrana plasmática dos espermatozóides e está contida na gema de ovo, sendo portanto, substrato perfeito para a ação hidrolítica da fosfolipase (ARAÚJO e CAMPOS, 2005).

Durante a estação não reprodutiva, as glândulas bulbouretrais hipertrofiam e aumentam a sua atividade, sob influência das altas concentrações plasmáticas de prolactina e produzem mais fosfolipase A_2 (NUNES, 1982). Isto está de acordo com o sugerido por La Falci et al. (2002), ao afirmarem que um excesso de atividade de fosfolipase A_2 pode ser observado no plasma seminal caprino durante a estação não sexual o que pode produzir lisolipídeos em excesso, os quais causam danos à membrana espermática.

2.2.3. As proteínas do plasma seminal e seus efeitos sobre o metabolismo espermático.

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

Desse modo, as proteínas do PS 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; BARRIOS et al., 2000; JONÁKOVÁ 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 fonte de enzimas metabólicas especialmente ativas, cujas liberações em grandes quantidades podem indicar danos na membrana plasmática do espermatozoide (BITTMAR e KOSINIAK, 1992).

Bhargava et al. (1959) encontraram altas concentrações de aminoácidos livres, e baixas concentrações de nucleotídeos e ácidos nucléicos no PS de touros. Alguns aminoácidos presentes no PS de ovinos tais como, a taurina e hipotaurina, parecem ter efeito positivo sobre a fertilidade. É possível que o melhoramento observado nas características de motilidade de espermatozoides ovinos congelados na presença da taurina possa ser devido a outros fatores que não sejam suas propriedades antioxidantes (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1997).

La Falci et al. (2002), estudando mudanças estacionais nos níveis de proteína totais no PS de caprinos 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 à quantidade de proteínas presentes. Além disso, os autores observaram que na estação reprodutiva foi encontrada uma proteína de maior peso molecular (178 kDa) do que àquelas encontradas da estação não reprodutiva (73-104 kDa). Atribuíram que tal diferença deva-se à estacionalidade, que tem relação com

a função espermática. Também têm sido sugerido que as proteínas do plasma seminal parecem ser 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 eqüinos, 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, tipo BSP (Proteínas Seminais Bovino), são responsáveis por promoverem o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana espermática (MOREAU e MANJUNATH, 2000), mesmo quando adicionada a espermatozoides do epidídimo (THÉRIEN et al., 1999).

2.3. Diluidores.

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 isso, os diluidores de sêmen devem conter material nutriente para o espermatozóide, além de possuir uma capacidade tamponante para neutralizar os produtos de seu metabolismo e assim, manter um pH adequado para sua sobrevivência (MCDONALD, 1947).

Os tampões devem ser utilizados para manter o balanço iônico e o pH do diluidor (FARSTAD, 1996; ROTA, 1998; HOLT, 2000; PEÑA, 2000). Na formulação de um diluidor de sêmen, a composição e o equilíbrio dos seus constituintes 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), sendo uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais, além de atuar 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, 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 combinação TRIS-gema (TG) foi mais eficiente em preservar a motilidade dos espermatozoides após congelação/descongelação quando comparado ao leite-gema (CHAUAN e ANAND, 1990). Estes autores descreveram ainda que a taxa de fertilidade do sêmen diluído em TRIS-gema, após descongelação, foi na ordem de 80% em cabras inseminadas duas vezes: uma logo ao ser detectado o cio natural e a segunda 12 h depois. Já Roca et al. (1997) descreveram fertilidade de 74% em cabras com estro sincronizado e inseminadas com sêmen diluído em TRIS-gema (2%) resfriado.

A composição do diluidor TG está expressa no quadro 1.

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

| Constituinte | Peso |
|-------------------------------------|------|
| TRIS – hidroximetil aminometano (g) | 3,63 |
| Frutose (g) | 0,50 |
| Ácido cítrico – monohidratado (g) | 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 alimento 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, sendo um agente tamponante que resiste a mudanças no pH do meio (Origem: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre, 2009).

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

O citrato de sódio aumenta a diluição da gema de ovo no meio líquido, favorecendo sua ação sobre os espermatozoides, além de atuar como quelante de cálcio, diminuindo a quantidade que atravessa a membrana espermática (HOLT, 2000).

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

A composição do diluidor CG está expressa no quadro 2.

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

| Constituinte | Quantidade |
|------------------------------------|------------|
| Citrato sódico – 2H ₂ O | 2,37 g |
| Glicose | 0,80 g |
| Gema de ovo | 2,50 mL |
| Água destilada q.s.p. | 100 mL |

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

3. JUSTIFICATIVA

Os espermatozóides epididimários constituem um excelente modelo experimental para testar os efeitos do plasma seminal sobre eles mesmos, uma vez que estes espermatozóides ainda não entraram em contato com as secreções das glândulas acessórias e com os diluidores utilizados na criopreservação. Na espécie caprina, o plasma seminal é considerado deletério sobre os espermatozóides (ROY, 1957; NUNES, 1982), e tal característica tem sido atribuída a uma enzima conhecida como fosfolipase do tipo A₂ secretada pelas glândulas bulbouretrais, que age sobre os fosfolipídios presentes nos diluidores levando à formação de lisolecitinas e ácidos graxos, que exercem ação tóxica sobre os espermatozóides (NUNES, 1982). Entretanto, estudos recentes demonstraram que esta enzima encontra-se em baixa atividade nos animais criados em clima tropical (AGUIAR, 2008; MATOS-BRITO, 2008), não se constituindo, portanto, no principal entrave para a conservação do sêmen de caprino.

Todavia, outros constituintes como a frutose e proteínas são encontrados no plasma seminal de caprinos em concentrações consideráveis mesmo em clima tropical (CATUNDA, 2007; AGUIAR, 2008). Matos-Brito (2007) conservou sêmen de caprinos com alta e baixa concentração de frutose do plasma seminal em diferentes diluidores e observou que o sêmen de animais com baixo nível de frutose no plasma seminal necessitou de diluidor com níveis energéticos adequados para uma conservação viável.

Diante do exposto, verificou-se que ainda há necessidade de maiores conhecimentos sobre o metabolismo espermático e a conservação *in vitro* de espermatozóides epididimários de caprinos, mesmo quando se tem conhecimento prévio da concentração inicial de frutose e de proteínas totais e da atividade da fosfolipase A₂ no plasma seminal desta espécie.

4. HIPÓTESES

- O plasma seminal de caprinos não é deletério aos espermatozóides epididimários quando a atividade da fosfolipase A₂ está abaixo de 15 UI;
- Para se prever a qualidade de conservação do sêmen de caprino em clima tropical, é mais importante conhecer a concentração inicial de frutose no plasma seminal de do que conhecer a intensidade de atividade de fosfolipase A₂ em clima tropical.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar os efeitos da adição e da composição do plasma seminal sobre as características dos espermatozóides epididimários de caprinos.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar nos espermatozóides epididimários de caprinos diluídos no TRIS-gema e Citrato-gema, os efeitos da adição do plasma seminal sobre as características de motilidade, vigor e TDM, a 0 (fresco) , 2 e 24h de conservação a 5 °C;
- Verificar se os níveis de frutose, proteínas totais e fosfolipase A₂ no plasma seminal beneficiam ou prejudicam a conservação de espermatozóides epididimários a 5 °C por até 24h de conservação.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. 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.

6.2. Animais experimentais.

Foram utilizados oito machos caprinos mestiços, com $40 \pm 5,91$ meses de idade, criados sob condições intensivas. A ração foi formulada segundo NRC (1981) para caprinos, de modo a conter em média 16% de proteína bruta (PB), a relação volumoso: concentrado foi de 60:40 na matéria seca e como volumoso foi fornecido o feno tifton 85. A mineralização foi incorporada à ração e a água fornecida *ad libidum*. O controle sanitário (anti-helmíntico e suplementação vitamínica) foi realizado conforme critérios pré-estabelecidos pela Embrapa-caprinos.

6.3. 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 através de vagina artificial com tubo coletor acoplado à extremidade e com o auxílio de uma cabra 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 (PS) 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 PS 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 análise bioquímica (frutose, proteínas totais e fosfolipase A₂) ou adição nos espermatozóides epididimários. Esta medida foi adotada para evitar descongelações desnecessárias das amostras.

6.4. Preparo dos diluidores.

Foram utilizados os diluidores Citrato-Gema ou CG (2,37g de citrato de sódio; 0,80g de glicose e 2,5% de gema de ovo em 100 mL de água destilada (q.s.p.) e TRIS-Gema ou TG (3,634 g de TRIS; 0,50 g de frutose, 1,99 g de ácido cítrico e 2,5% de gema de ovo em 100 ml de água destilada (q.s.p.) preparados segundo Evans e Maxwell (1990).

6.5. Castração e obtenção dos espermatozóides epididimários.

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 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 retirados 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), onde os espermatozóides foram coletados por escarificação e pequenos cortes na cauda do epidídimo. O conteúdo epididimário foi coletado em tubos de ensaio. Foi feito um “pool” dos espermatozóides das duas caudas do epidídimo e em seguida, foram retiradas quatro alíquotas de 100 µL e postas em tudo de ensaio. Em duas das amostras foram adicionados 120 µL de plasma seminal autólogo, ou seja, o PS e os EEP 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. Em seguida, uma amostra contendo espermatozóides e plasma seminal (i) e outra contendo apenas espermatozóides (controle - ii) foram diluídas no diluidor citrato-gema. As outras duas amostras com PS (iii) e sem PS (controle - iv) foram diluídos no TRIS-gema a uma concentração de 200×10^6 spz/ mL. Os EEP diluídos

foram avaliados quanto ao vigor e motilidade, por meio do teste de termorresistência lento (TTR), em banho-maria a 38° C, no estado fresco (0 h) e após duas (2) e 24 h de conservação a 5° C, A TDM foi calculada conforme a seguinte fórmula:

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

6.6. Avaliação bioquímica do plasma seminal.

O plasma seminal obtido e conservado a -18 °C foi avaliado quanto à concentração de frutose, de proteínas totais e atividade da fosfolipase A₂. Para a determinação dos níveis de frutose e de proteínas totais 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 amostra 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 x 10⁻³ e 6 x 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 /minuto/ 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.

6.7. Análise Estatística.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SAS[®]. O delineamento experimental empregado foi o 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 ANOVA, e quando foram encontradas diferenças, as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

7. RESULTADOS

7.1. Resultados gerais sobre os parâmetros seminais.

Quando os dados foram analisados independentes do conhecimento prévio das concentrações de frutose e de proteínas totais e da intensidade de atividade da fosfolipase A₂ no PS, os seguintes resultados foram encontrados:

O prolongamento do tempo conservação promoveu alterações significativas do vigor e da motilidade dos EEP diluídos no TG com e sem adição de PS e no CG sem a adição de PS (tabelas 1 e 2). Sobre a TDM, o efeito do tempo de conservação foi observado apenas no TG com adição PS (tabela 3).

No que se refere ao tratamento foi constatado, que a adição do PS provocou diminuição dos parâmetros de vigor e motilidade em ambos diluidores (tabelas 1 e 2). Apesar do resultado da TDM ser dependente do vigor, a adição de PS promoveu efeito deletério principalmente no CG, ocorrendo aumento considerável dos valores percentuais. Porém, no diluidor TG o efeito negativo da adição do PS foi verificado apenas com os EEP no estado fresco (tabela 3).

No tocante ao tipo de diluidor utilizado, diferenças significativas só foram verificadas para o vigor com 24 horas de conservação quando houve adição de PS, e o melhor resultado foi constatado no TG (tabela 1). Não foi observada diferença entre os diluidores para a motilidade (tabela 2), todavia, foram observadas diferenças significativas entre os diluidores para a TDM em todos os momentos da conservação quando o PS foi adicionado (tabela 3). Dessa forma, uma maior degradação seminal foi constatada no diluidor CG.

Tabela 1. Médias e desvio-padrão do vigor dos espermatozóides epididimários de caprinos diluídos nos Tris-gema (TG) e Citrato-gema (CG) conservados a 5 °C por até horas.

| Tempo de Conservação | VIGOR | | | |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | TRIS-GEMA | | CITRATO-GEMA | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 h | 1,96±0,35 ^{2,b} | 2,69±0,48 ^{1,a} | 1,63±0,52 ^b | 2,73±0,50 ^{1,a} |
| 2 h | 1,67±0,47 ^{2,b} | 2,11±0,62 ^{2,a} | 1,65±0,80 ^b | 2,17±0,76 ^{2,a} |
| 24 h | 2,27±0,77 ^{1,A} | 2,67±0,79 ¹ | 1,38±0,29 ^{b,B} | 2,40±0,53 ^{1,a} |

Letras maiúsculas: comparação entre diluidores (P<0,05); Letras minúsculas: comparação entre tratamento com ou sem PS (P<0,05); Números comparação entre tempos de conservação (P<0,05).

Tabela 2. Médias e desvio-padrão da motilidade dos espermatozóides epididimários diluídos nos diluidores Tris-gema (TG) e Citrato-gema (CG) conservados a 5 °C por até 24 horas.

| Tempo de Conservação | MOTILIDADE | | | |
|----------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | TRIS-GEMA | | CITRATO-GEMA | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 h | 48,75±10,97 ^{1,2,b} | 63,13±11,97 ^{1,a} | 41,04±13,94 ^b | 62,50±8,31 ^{1,a} |
| 2 h | 39,17±9,89 ^{2,b} | 52,92±17,77 ^{2,a} | 38,33±18,69 ^b | 51,25±13,21 ^{2,a} |
| 24 h | 51,33±20,36 ^{1,a} | 60,42±18,12 ^{2,a} | 37,50±13,71 ^b | 58,33±10,39 ^{1,2,a} |

Letras maiúsculas: comparação entre diluidores (P>0,05); Letras minúsculas: comparação entre tratamento com ou sem PS (P<0,05); Números: comparação entre tempos de conservação (P<0,05).

Tabela 3. Médias e desvio-padrão da Taxa de Degradação da Motilidade (TDM) dos espermatozóides epididimários diluídos nos diluidores Tris-gema e Citrato-gema conservados a 5 °C por até 24 horas.

| Tempo de Conservação | Taxa de Degradação da Motilidade (TDM) | | | |
|----------------------|--|---------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | Tris-Gema | | Citrato-Gema | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 h | 55,06 ± 31,78 ^{2,b,B} | 24,63 ± 8,37 ^a | 82,14 ± 26,30 ^{b,A} | 30,28 ± 9,61 ^a |
| 2 h | 55,63 ± 21,29 ^{2,B} | 33,83 ± 24,54 | 79,02 ± 30,33 ^{b,A} | 40,86 ± 28,77 ^a |
| 24 h | 22,86 ± 25,46 ^{1,B} | 29,20 ± 18,41 | 52,08 ± 33,59 ^{b,A} | 22,71 ± 16,99 ^a |

Letras maiúsculas: comparação entre diluidores (P<0,05); Letras minúsculas: comparação entre tratamento com ou sem PS (P<0,05); Números: comparação entre tempos de conservação (P<0,05).

7.2. Efeito da atividade da fosfolipase A₂ (FLA₂) do plasma seminal sobre os parâmetros dos EEP de caprinos.

Após reagrupar os animais doadores de PS e de EEP conforme a intensidade de atividade da enzima FLA₂ (grupo A: FLA₂ > 11 U/mL e grupo B: FLA₂ < 7 U/mL), encontraram-se os seguintes resultados:

Os parâmetros de vigor e motilidade não foram afetados pelo tempo de conservação (tabela 4). Apenas a TDM dos EEP do grupo B, diluídos no TG e adicionados de PS foi significativamente alterada (tabela 4). Do mesmo modo, somente neste parâmetro foi observada diferença significativa entre os diluidores, e as menores degradações foram encontradas nos EEP do grupo A quando adicionados de PS e diluídos no TG (tabela 5).

No que se refere ao tratamento, apenas no grupo A e no TG, a adição de PS nos EEP diminuiu significativamente do vigor e da motilidade, aumentou significativamente a TDM. Não foi encontrada diferença entre os grupos A e B.

Tabela 4. Efeito da fosfolipase A₂ do plasma seminal sobre o vigor e a motilidade dos espermatozoides epididimários de caprinos.

| GRUPO A | | | | | | | | |
|------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| Tempo (horas) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
| | VIGOR | | MOTILIDADE | | VIGOR | | MOTILIDADE | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 1,47±0,49 ^b | 2,63±0,32 ^a | 36,67±11,06 ^b | 60,67±8,63 ^a | 1,97±0,32 | 2,63±0,40 | 47,33±9,54 | 60,33±11,57 |
| 2 | 1,63±0,96 | 2,00±0,68 | 40,00±22,61 | 49,33±14,60 | 1,73±0,56 | 2,07±0,66 | 41,33±12,16 | 53,33±17,48 |
| 24 | 1,25±0,36 ^b | 2,53±0,49 ^a | 33,33±18,86 ^b | 60,67±12,11 ^a | 2,22±0,69 | 2,73±0,88 | 50,00±16,67 | 61,33±20,08 |

| GRUPO B | | | | | | | | |
|------------------|----------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| Tempo (horas) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
| | VIGOR | | MOTILIDADE | | VIGOR | | MOTILIDADE | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 1,89±0,54 | 2,89±0,79 | 48,34±17,56 | 65,56±8,39 | 1,95±0,48 | 2,78±0,68 | 51,11±15,03 | 67,78±13,47 |
| 2 | 1,67±0,60 | 2,44±0,96 | 35,55±13,47 | 54,44±12,62 | 1,56±0,34 | 2,17±0,67 | 35,55±3,85 | 58,89±13,48 |
| 24 | 1,50±0,24 | 2,17±0,60 | 41,67±11,79 | 54,45±6,94 | 2,34±1,18 | 2,56±0,77 | 53,34±33,00 | 58,89±18,36 |

Grupo A: FLA₂ > 11 UI e grupo B: FLA₂ < 7 UI;

Letras maiúsculas comparação entre diluidores (p>0,05); Letras minúsculas comparação entre tratamentos com e sem PS (p<0,05); Números comparação entre tempos de conservação (p>0,05).

Tabela 5. Efeito da fosfolipase A₂ do plasma seminal sobre a TDM dos espermatozóides epididimários de caprinos.

| Tempo (h) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
|--------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| | GRUPO A | | GRUPO B | | GRUPO A | | GRUPO B | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 93,33 ± 14,91 ^{b,A} | 30,24 ± 11,87 ^a | 63,49 ± 33,79 | 30,36 ± 6,44 | 54,76 ± 32,03 ^B | 25,83 ± 9,50 | 55,55 ± 38,49 ² | 22,62 ± 7,44 |
| 2 | 90,00 ± 22,36 ^{b,A} | 37,38 ± 37,30 ^a | 60,71 ± 37,63 | 46,67 ± 5,77 | 50,00 ± 5,05 ^B | 33,45 ± 25,74 | 61,67 ± 37,53 ² | 34,45 ± 27,96 |
| 24 | 75,00 ± 35,35 ^{b,A} | 13,00 ± 12,04 ^a | 29,17 ± 5,89 | 38,87 ± 9,62 | 33,33 ± 28,87 ^B | 29,00 ± 11,94 | 7,15 ± 10,10 ¹ | 29,53 ± 30,01 |

Grupo A: FLA₂ > 11 UI e grupo B: FLA₂ < 7 UI;

Letras maiúsculas comparação entre diluidores (p<0,05); Letras minúsculas comparação entre tratamentos com e sem PS (p<0,05); Números comparação entre tempos de conservação (p<0,05).

7.3. Efeito da concentração de frutose do plasma seminal sobre os parâmetros dos EEP de caprinos.

Outros resultados foram observados quando os animais doadores de PS e dos EEP foram agrupados conforme a concentração de frutose (grupo A: Frutose > 650 mg/dL e grupo B: Frutose < 540 mg/dL), pois permitiu verificar diferenças muito importantes sobre o período de conservação, o diluidor utilizado e o grupo experimental (Tabela 6 e 7). O efeito do tempo de conservação foi observado, principalmente, no grupo B sobre o vigor, a motilidade e a TDM, quando os EEP foram diluídos no TG e mais fortemente quando o PS foi adicionado.

No tocante ao diluidor utilizado, os efeitos foram observados no grupo A na TDM, quando PS foi adicionado, e os melhores índices foram encontrados no TG. Já no grupo B, os efeitos foram verificados sobre o vigor, com e sem PS, com 24h de conservação, e os melhores resultados foram constatados no TG.

Tabela 6. Efeito da frutose do plasma seminal sobre o vigor e a motilidade dos espermatozoides epididimários de caprinos.

| GRUPO A | | | | | | | | |
|------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Tempo (horas) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
| | VIGOR | | MOTILIDADE | | VIGOR | | MOTILIDADE | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 1,28 ± 0,35 ^b | 2,28 ± 0,25 ^{1,a} | 32,22 ± 12,62 ^b | 53,33 ± 3,34 ^d | 1,72 ± 0,09 | 2,17 ± 0,17 ^{**} | 44,45 ± 6,94 | 50,55 ± 6,31 ^{**} |
| 2 | 0,94 ± 0,20 ^{**} | 1,39 ± 0,26 ^{2,*} | 25,55 ± 6,94 ^{**} | 37,78 ± 6,94 ^{**} | 1,22 ± 0,25 ^{**} | 1,56 ± 0,10 ^{**} | 34,44 ± 1,93 | 40,00 ± 3,33 ^{**} |
| 24 | 1,28 ± 0,25 ^b | 1,94 ± 0,42 ^{1,2,a,*} | 33,33 ± 13,34 | 48,89 ± 6,94 ^{**} | 1,72 ± 0,25 ^{**} | 1,78 ± 0,35 ^{**} | 37,78 ± 10,72 ^{**} | 41,11 ± 11,70 ^{**} |

| GRUPO B | | | | | | | | |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Tempo (horas) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
| | VIGOR | | MOTILIDADE | | VIGOR | | MOTILIDADE | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 1,83 ± 0,51 ^b | 3,00 ± 0,41 ^a | 46,34 ± 12,93 ^b | 68,00 ± 3,80 ^a | 2,10 ± 0,38 ^{b2} | 3,00 ± 0,24 ^{*1a} | 51,33 ± 12,82 ^{b2} | 70,67 ± 6,41 ^{*a} |
| 2 | 2,07 ± 0,70 ^{*b} | 2,63 ± 0,50 ^{**a} | 46,00 ± 19,78 ^{*b} | 59,33 ± 7,96 ^{*a} | 1,93 ± 0,34 ^{*b2} | 2,43 ± 0,55 ^{*2a} | 42,00 ± 11,93 ^{b2} | 64,67 ± 10,95 ^{*a} |
| 24 | 0,00 ± 0,00 ^B | 2,67 ± 0,39 ^{**B} | 0,00 ± 0,00 | 64,00 ± 7,60 [*] | 3,09 ± 0,12 ^{*A1} | 3,20 ± 0,27 ^{*A1} | 71,67 ± 7,07 ^{*1} | 72,00 ± 7,67 [*] |

O grupo A contém frutose > 650 mg/dL e grupo B < 540 mg/dL de frutose;
 Letras maiúsculas comparação entre diluidores (p<0,05); Letras minúsculas comparação entre tratamentos com e sem PS (p<0,05); Números comparação entre tempos de conservação (p<0,05); *Asterisco comparação entre os grupos A e B (p<0,05).

Tabela 7. Efeito da frutose do plasma seminal sobre a TDM dos espermatozoides epididimários de caprinos.

| Tempo (h) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
|--------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| | GRUPO A | | GRUPO B | | GRUPO A | | GRUPO B | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 85,71 ± 24,75 ^{b,B} | 22,02 ±8,44 ^a | 80,00 ± 29,82 ^b | 35,24 ± 6,65 ^a | 35,71 ± 20,34 ^A | 30,36 ± 6,44 | 66,67 ± 33,34 ^{b,1,2} | 21,19 ± 7,91 ^a |
| 2 | 75,00 ± 43,30 ^b | 32,78 ± 7,52 ^a | 81,43 ± 25,56 ^b | 45,72 ± 36,63 ^a | 41,67 ± 14,43 | 26,11 ± 6,73 | 62,00 ± 22,26 ¹ | 38,45 ± 30,97 |
| 24 | 61,11 ± 34,70 ^B | 23,33 ± 25,17 | 0,00 ± 0,00 | 22,33 ± 13,72 | 16,67 ± 28,87 ^A | 43,33 ± 20,82 | 32,15 ± 25,25 ² | 20,72 ± 11,68 |

O grupo A contém frutose > 650 mg/dL e grupo B < 540 mg/dL de frutose;

Letras maiúsculas comparação entre diluidores ($p < 0,05$); Letras minúsculas comparação entre tratamentos com e sem PS ($p < 0,05$); Números comparação entre tempos de conservação ($p < 0,05$); *Asterisco comparação entre os grupos A e B ($p > 0,05$).

7.4. Efeito da concentração das proteínas totais do plasma seminal sobre os parâmetros dos EEP de caprinos.

O agrupamento dos animais de acordo com a concentração de proteínas totais presentes no PS (grupo A: Proteína $> 4,3$ g/dL e grupo B: < 4 g/dL) resultou nas seguintes observações (Tabela 8 e 9): o resultado mais evidente foi o efeito do tratamento, pois a adição de PS nos EEP, em ambos os grupos, no CG e durante os tempos iniciais da conservação diminuiu a qualidade de conservação (tabela 8). No grupo B e no CG, o efeito do tratamento sobre a TDM foi observado durante todo o período de conservação (tabela 9).

Tabela 8. Efeito das proteínas totais do plasma seminal sobre o vigor e a motilidade dos espermatozoides epididimários de caprinos.

| GRUPO A | | | | | | | | |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------|---------|-------------|--------|------------|---------|
| Tempo (horas) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
| | VIGOR | | MOTILIDADE | | VIGOR | | MOTILIDADE | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 1,72 ± | 2,78 ± | 38,89 ± | 62,22 ± | 2,00 ± | 2,72 ± | 45,56 ± | 60,00 ± |
| | 0,48 ^b | 0,35 ^a | 13,48 | 8,39 | 0,44 | 0,51 | 12,62 | 15,28 |
| 2 | 1,94 ± | 2,28 ± | 46,67 ± | 54,44 ± | 2,00 ± | 2,28 ± | 46,67 ± | 58,89 ± |
| | 1,17 | 0,67 | 28,48 | 13,88 | 0,50 | 0,84 | 13,34 | 21,69 |
| 24 | 0,00 ± | 2,72 ± | 0,00 ± 0,00 | 65,56 ± | 2,34 ± | 2,83 ± | 50,00 ± | 61,11 ± |
| | 0,00 | 0,54 | | 10,18 | 0,94 | 1,15 | 23,57 | 27,15 |

| GRUPO B | | | | | | | | |
|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------|--------|------------|---------|
| Tempo (horas) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
| | VIGOR | | MOTILIDADE | | VIGOR | | MOTILIDADE | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 1,57 ± | 2,70 ± | 42,34 ± | 62,67 ± | 1,93 ± | 2,67 ± | 50,67 ± | 65,00 ± |
| | 0,58 ^b | 0,62 ^a | 15,62 ^b | 9,25 ^a | 0,34 | 0,52 | 10,90 | 11,06 |
| 2 | 1,47 ± | 2,10 ± | 33,33 ± | 49,33 ± | 1,47 ± | 2,00 ± | 34,67 ± | 53,33 ± |
| | 0,56 | 0,88 | 11,06 | 14,02 | 0,36 | 0,53 | 3,80 | 12,70 |
| 24 | 1,33 ± | 2,20 ± | 34,44 ± | 54,00 ± | 2,22 ± | 2,57 ± | 52,22 ± | 60,00 ± |
| | 0,34 | 0,46 | 15,03 | 8,63 | 0,86 | 0,62 | 23,41 | 14,34 |

O grupo A continha proteínas totais $> 4,3$ g/dL e o grupo B: < 4 g/dL de proteína.

Letras maiúsculas comparação entre diluidores; Letras minúsculas comparação entre tratamentos com e sem PS; Números comparação entre tempos de conservação; Asterisco comparação entre os grupos A e B.

Tabela 9. Efeito das proteínas totais do plasma seminal sobre a TDM dos espermatozoides epididimários de caprinos.

| Tempo (h) | CITRATO – GEMA | | | | TRIS - GEMA | | | |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|---------------------|---------|
| | GRUPO A | | GRUPO B | | GRUPO A | | GRUPO B | |
| | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS | Com PS | Sem PS |
| 0 | 88,89 ± | 30,95 ± | 78,09 ± | 29,88 ± | 63,49 ± | 23,61 ± | 50,00 ± | 25,24 ± |
| | 19,24 ^a | 16,20 ^b | 31,15 ^a | 5,46 ^b | 33,79 | 12,03 | 33,33 ¹ | 7,01 |
| 2 | 83,33 ± | 53,97 ± | 76,43 ± | 33,00 ± | 50,00 ± | 44,64 ± | 57,00 ± | 27,33 ± |
| | 28,87 | 39,93 | 34,22 ^a | 21,10 ^b | 7,14 | 24,03 | 27,29 ¹ | 24,99 |
| 24 | 0,00 ± | 21,67 ± | 52,78 ± | 23,33 ± | 50,00 ± | 33,33 ± | 4,76 ± | 26,72 ± |
| | 0,00 | 2,89 | 41,11 ^A | 22,36 | 0,00 ^{**} | 14,43 | 8,25 ^{*B2} | 21,64 |

O grupo A continha proteínas totais > 4,3 g/dL e o grupo B: < 4 g/dL de proteína.

Letras maiúsculas comparação entre diluidores; Letras minúsculas comparação entre tratamentos com e sem PS; Números comparação entre tempos de conservação; Asterisco comparação entre os grupos A e B.

8. DISCUSSÃO

8.1. Discussão geral dos parâmetros seminais.

Inicialmente, foi observado efeito significativo do tempo de conservação (0, 2 e 24h), do tratamento (com ou sem a adição de PS) e do meio de diluição (TG e CG) sobre o vigor dos EEP. Entretanto, alguns achados foram muito interessantes, pois se verificou que o vigor e a motilidade foram melhores com 24 h do que com 2 h de conservação. Estudos anteriores encontraram diminuição dos parâmetros seminais (AGUIAR, 2008), enquanto outros, utilizando os mesmos diluidores (MATOS-BRITO, 2008) ou a água de coco *in natura* (CAMPOS et al., 2004) não verificaram decréscimo dos parâmetros seminais até 24 h de conservação a 5 °C. Supõe-se que essa melhora no vigor e na motilidade dos EEP com 24 horas de conservação, possa ser atribuída a uma série de adaptações de ordem metabólica ocorridas nestas células em contato com o meio diluidor e/ou com o plasma seminal. Scott et al. (1967) sugeriram que os lipídios da membrana espermática podem ser utilizados como substrato para os espermatozoides durante a maturação no epidídimo levando a mudanças na permeabilidade da membrana. As duas importantes rotas de geração de ATP são o ciclo de Krebs e a β -oxidação os quais precedem a fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons (LARDY e PHILLIPS, 1941; ST JOHN et al., 2005). Originalmente o metabolismo dos EEP 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).

A L-carnitina do fluido epididimário é proveniente da circulação sanguínea e sua captação é regulada por andrógenos, e se difunde passivamente através da membrana espermática onde se acumula no citosol. A alta concentração de acetil-CoA inibe algumas enzimas chave, em especial a piruvato desidrogenase e a α -cetoglutarato desidrogenase, responsáveis pela regulação das vias de utilização de carboidratos para produção de ATP (JEULIN e LEWIN, 1996; NG et al., 2004). Outros estudos demonstraram que a adição de D,L-carnitina parece alterar o metabolismo da glicose nos espermatozoides da cauda, mas não daqueles provenientes da cabeça e corpo do epidídimo (INSKEEP e HAMMERSTEDT, 1982). Outros trabalhos realizados no mesmo laboratório, com espermatozoides epididimários constataram que independente dos diluidores utilizados, não foi observada variação significativa nos parâmetros avaliados no decorrer de 2, 24 e 48

horas de conservação para motilidade e vigor, respectivamente (LIMA et al., dados não publicados). Podendo-se sugerir que os EEP após 2 horas de conservação *in vitro* ainda não estejam hábeis em utilizar plenamente o açúcar disponível no meio diluidor, visto que, possivelmente, o metabolismo oxidativo ainda seja a fonte de energia prioritária para estas células no momento, apesar da adição do plasma seminal.

No que se refere à adição de PS sobre os EEP foi confirmado o que já havia sido relatado em outros estudos, isto é, que o PS 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).

Nunes (1982) sugeriu que o PS é capaz de eliminar espermatozóides, pois parte das secreções das glândulas acessórias provoca extensiva morte celular. Outros estudos também sugerem que a presença ou ausência de alguns componentes bioquímicos no plasma seminal interferem na sobrevivência espermática (MAXWELL e JOHNSON, 1999).

Pouca diferença foi encontrada com relação ao diluidor, porém foi constatado que os resultados foram mais favoráveis no TG. Possivelmente, este resultado possa ser atribuído à capacidade tamponante do diluidor TG (MCDONALD, 1947; CUNHA e LOPES, 2000; VERSTEGEM et al., 2005), pois o diluidor TRIS tem maior poder tampão que o fosfato ou o citrato, podendo ultrapassar a membrana plasmática e reduzir as variações intracelulares do pH (SALAMON e MAXWELL, 2000). Outros trabalhos utilizando o diluidor TG para conservação de sêmen caprino obtiveram bons resultados *in vitro* (MATOS-BRITO, 2008) e de fertilidade (VIANA et al., 2006; ROCA et al., 1997).

8.2. Efeito da atividade da fosfolipase A₂ (FLA₂) do plasma seminal sobre os parâmetros dos EEP de caprinos.

Vários estudos têm demonstrado que a FLA₂ presente no PS de caprinos exerce efeito deletério sobre a viabilidade dos espermatozóides conservados em meio à base de leite desnatado ou contendo gema de ovo constituindo um problema específico para a conservação do sêmen caprino (LEBBOEUF et al., 2003; PELLICER-RUBIO et al., 1997). Quando espermatozóides caprinos foram lavados pelo menos uma vez antes da diluição, foi observada melhora na sobrevivência espermática após resfriamento a 4 °C, em comparação com espermatozóides ejaculados não lavados (ROY, 1957; IRITANI et al., 1964). Desse modo, os estudos têm demonstrado o efeito positivo da lavagem sobre a

motilidade do espermatozóide caprino, mostrando que a remoção do plasma seminal foi benéfica na preservação da integridade dos espermatozoides, mesmo após a congelação (MEMON et al., 1985). Acredita-se que as secreções das glândulas bulbo-uretrais promovem a diminuição na motilidade e vigor dos espermatozoides, além de causar danos ao acrossoma e a morte celular de espermatozoides caprinos (PELLICER-RUBIO et al., 1997). Pesquisas recentes têm demonstrado que, mesmo em clima tropical, a remoção do plasma seminal antes da conservação a 4 °C melhora o vigor e a motilidade dos espermatozoides caprinos lavados e conservados até 24 h (CAMPOS et al., 2003). Neste trabalho, nenhuma diferença significativa na atividade da FLA₂ foi observada entre os grupos A e B. Do mesmo modo, não foi encontrada qualquer diferença entre diluidores e tratamento no grupo B (Tabela 4 e 5). Estes resultados sugerem que quando o nível de atividade da FLA₂ no plasma seminal de caprinos estiver abaixo de 11 U/mL, os diluidores convencionais, como o TRIS e o Citrato de Sódio, podem ser utilizados sem a necessidade de realização de lavagem prévia do sêmen. Além disso, a inexistência de diferença entre os grupos A e B, demonstra que apesar do grupo ter sido classificado como sendo de alta atividade de FLA₂, os níveis encontrados estavam abaixo do necessário para que seja observado qualquer efeito deletério sobre os EEP. Entretanto, os resultados confirmaram os efeitos deletérios do plasma seminal, conforme observado no grupo A, sugerindo que outros constituintes presentes no líquido seminal, associados à FLA₂ estejam exercendo efeitos indesejáveis sobre os EEP de caprinos.

8.3. Efeito da concentração de frutose do plasma seminal sobre os parâmetros dos EEP de caprinos.

Os resultados encontrados (tabela 6 e 7) parecem indicar uma preferência dos EEP de caprinos pelo diluidor TG, mesmo após adição do PS. Diferindo do encontrado por Matos-Brito (2008) que não observou diferença significativa entre os diluidores CG e TG para o vigor, a motilidade e a TDM de espermatozoides ejaculados de caprinos após os animais serem agrupados conforme o nível de frutose presente no PS. O presente estudo sugere que mesmo após a diluição e na presença de PS, os EEP de caprinos parecem ainda apresentar metabolismo um pouco diferente daquele advindo do ejaculado. Alguns autores observaram que em condições aeróbicas, pouca diferença foi encontrada na motilidade dos

EEP e do ejaculado, tanto na presença (100 a 200 mg/ 100 mL) quanto na ausência de frutose (WHITE e WALES, 1961). Os autores também verificaram que, em condições anaeróbicas e na ausência da frutose, a motilidade dos EEP diminuiu mais rapidamente que nas células espermáticas do ejaculado. Estudos posteriores demonstraram que os EEP utilizam a frutose a partir da via glicolítica, originando piruvato para a geração de ATP. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o metabolismo energético, já que apenas diluir e adicionar PS parece não tornar o metabolismo do EEP *in vitro* similar àquele advindo do ejaculado.

Quando os animais foram agrupados segundo os níveis de frutose presentes no PS, muitas diferenças entre os grupos foram constatadas. Visto que, independente do diluidor (TG ou CG) e tratamento (com ou sem PS), o vigor e a motilidade foram fortemente influenciados, de modo que os melhores resultados foram encontrados no grupo B, ou seja, naquele que apresentou baixo nível de frutose no PS (Tabela 5). Estes resultados diferiram mais uma vez dos encontrados por Matos-Brito (2008), pois o autor não encontrou diferença entre os grupos de alta ou baixa frutose, apesar de utilizar os mesmos diluidores. Porém em espermatozóides do ejaculado, o autor atribuiu tal fato às boas características conservadoras dos diluidores, visto que os mesmos dispõem de aporte energético viável ao espermatozóide. No presente estudo, a diferença encontrada pode ser atribuída à atividade metabólica do EEP, pois os mesmos parecem não depender unicamente do aporte energético do diluidor.

No tocante ao tratamento, a adição de PS promoveu diminuição da qualidade dos EEP, independente do grupo estudado. A diminuição da qualidade espermática no grupo A, foi observada sobre o vigor, a motilidade e a TDM dos EEP diluídos apenas no CG. Já no grupo B, as alterações sobre o vigor e a motilidade foram encontradas em ambos os diluidores. Aguiar (2008) constatou que a adição de PS caprino aos EEP resfriados a 4°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).

Um aspecto observado neste trabalho foi que houve, também, diferença entre os tratamentos sem adição de PS (controles) entre os grupos, de modo que os melhores resultados de vigor e motilidade foram verificados no grupo B, no TG às 24 h de conservação. Simplício et al. (2003) afirmaram que a capacidade reprodutiva de ovinos e caprinos na maior parte do país, está aquém das suas potencialidades reais, o que denota o uso de sistemas de produção incompatíveis com o potencial biológico desses animais.

Entretanto, no estudo atual mesmo provendo as condições necessárias para que os animais pudessem expressar plenamente suas características reprodutivas, constatou-se um baixo desempenho dos EEP, mesmo sem a adição do PS. Acredita-se, que a baixa qualidade verificada nas células espermáticas possa ser atribuída a características inerentes dos caprinos mestiços, visto que o processo adaptativo reduziu não só as características produtivas, mas também o potencial reprodutivo nesses animais. Outros estudos conduzidos com ovinos mestiços também demonstraram que o potencial reprodutivo desses animais é inferior ao das raças melhoradas ou de outros animais mestiços criados em outras regiões do país (MARTINS, 2006). O mesmo autor constatou um menor número de células germinativas nos estágios finais de diferenciação que nos estágios iniciais da espermatogênese no epitélio seminífero de ovinos, indicando alto processo degenerativo. Alguns estudos têm demonstrado que o epidídimo de mamíferos age selecionando os espermatozóides durante a maturação e o armazenamento, sendo esta uma adaptação para aumentar a qualidade e quantidade de espermatozóides no ejaculado (JONES et al., 2007).

Por outro lado, a frutose tem se mostrado um bom parâmetro para a seleção de reprodutores, uma vez que a mesma está relacionada com o metabolismo espermático. Além disso, a frutose está relacionada com as características de vigor e motilidade dos espermatozóides (MANN, 1954). Os resultados deste trabalho sugeriram uma menor capacidade dos EEP caprinos em utilizar o açúcar disponível no diluidor e no PS, conforme já observado por Wallace e Wales (1964) em EEP da espécie ovina. Todavia, na espécie caprina não há relatos de como os espermatozóides utilizam a frutose no metabolismo energético, os poucos dados existentes são apenas informativos sobre a concentração deste monossacarídeo no PS (BARAKAT et al., 1972; ANAND, 1973; MENDONZA et al., 1989; ROCA et al., 1993; PINHEIRO et al., 1996; RODRIGUES, 1997; CATUNDA, 2007).

8.4. Efeito da concentração das proteínas totais do plasma seminal sobre os parâmetros dos EEP de caprinos.

Os resultados deste estudo demonstraram que no diluidor TG, praticamente não foi observado efeito de tempo de conservação, de diluidor, de tratamento e de grupo. Isto sugere que este diluidor promoveu melhor proteção às células espermáticas. Martins et al.,

(2000), sugeriram que os EEP têm a qualidade equivalente ao espermatozóide ejaculado, sendo capaz de resistir aos efeitos deletérios da criopreservação.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o diluidor TG para a conservação do sêmen caprino obtendo resultados satisfatórios na fertilidade (VIANA et al., 2006; ROCA et al., 1997). Estes resultados corroboram com os encontrados no estudo atual, constatando mais uma vez a eficiência do TG na preservação de espermatozoides de caprino. Questiona-se, neste estudo, se o TG interfere bloqueando ou minimizando o efeito deletério do plasma seminal sobre as células espermáticas epididimárias de caprinos. Ao contrário disto, no diluidor CG foi possível verificar os efeitos deletérios do plasma seminal sobre os EEP, sugerindo que o CG não foi eficiente para a manutenção da proteção dos EEP de caprinos.

O PS contém fatores que interferem na manutenção da viabilidade espermática e que modulam a sua função, além disso, a função do espermatozóide pode ser influenciada pela estação do ano (LA FALCI et al., 2002). As proteínas do PS em ruminantes são encontradas em agregados protéicos de alto peso molecular, que na presença de citrato e em condições ácidas, separam-se em moléculas protéicas de baixo peso molecular que são prejudiciais a motilidade espermática (AL SOMAI et al., 1994). Baas et al. (1983), trabalhando com sêmen bovino demonstraram claramente que o PS foi responsável pela perda prematura da motilidade espermática e inativação permanente do metabolismo espermático.

O metabolismo espermático resulta numa grande quantidade de metabólitos tóxicos, acarretando o aumento da concentração de íon de hidrogênio e de ácido láctico no meio extracelular. O acúmulo destes metabólitos pode causar a morte das células espermáticas devido à drástica diminuição do pH no meio (FARSTAD, 1996; HOLT, 2000). O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano- $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) é o principal componente básico dos diluentes do sêmen de caprinos 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 utilizando o tampão tris-frutose original, enquanto outros preferem aperfeiçoar este tampão substituindo a frutose pela glicose ou pelos dissacarídeos não penetrantes (sacarose e lactose) que também podem ainda agir como crioprotetores extracelulares.

O presente trabalho sugere que o TG não permitiu o desenvolvimento de um pH capaz de expressar o efeito deletério de algumas proteínas presentes no plasma seminal.

8. CONCLUSÃO

A adição de plasma seminal aos espermatozóides epididimários promoveu diminuição significativa dos parâmetros seminais avaliados, exceto no diluidor TRI-gema, quando os animais foram reagrupados de acordo com a concentração de proteínas totais no plasma seminal.

O diluidor TRIS-gema preservou melhor os espermatozóides epididimários de caprinos, quando a concentração de frutose esteve abaixo de 540 mg/dL, sugerindo que apesar da adição do plasma seminal, o metabolismo espermático pode diferir daquele proveniente do ejaculado, característica que pode ser atribuída a adaptações de ordem metabólica.

A concentração a concentração inicial de frutose no plasma seminal influenciou a qualidade de conservação dos espermatozóides epididimários; já a de proteínas totais afetou apenas a conservação no citrato – gema e a intensidade de atividade da fosfolipase A₂ não interferiu na conservação a 5 ° C dos espermatozóides epididimários de caprinos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.** 2008, 121p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

AL-SOMAI A. N.; VISHWANATH B.C. R., SHANNON B.; MOLA C.P. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull Sperm. **Reproduction Fertility Development**, Collingwood , v. 6, p.165-171, 1994.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. R. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction Fertility Development**, Collingwood, v. 5, p. 361-381, 1993.

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

ANAND R. S. The carbohydrates of buffalo and goat semen, *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 32, pg. 97-10, 1973.

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

AURICH, J. E.; KÜNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v.46, p. 791-797, 1996.

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 68, p. 275 – 280, 1983.

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

BHARGAVA P. M.; BISHOP M. W. H.; WORK T. S. The chemical composition of bull semen with special reference to nucleic acids, free nucleotides and free amino acids. **Biochemical Journal**, Philadelphia, v. 73, n. 2, p. 242–247, 1959.

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

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**, New York, v. 52, p.863-873, 1999.

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

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

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

CARDOZO, J. A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Monthly variations in ovine seminal plasma

proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, **Theriogenology**, New York, v. 66, p. 841–850, 2006.

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

CHEMINEAU B.; BALLE L. F.; FOURCADE O.; NAUZE M.; DELAGEBEAUDEUF C.; GASSAMA-DIAGNE A.; SIMON M.; FAUVEL J.; CHAP H. New Developments in Phospholipase A₂. **Lipids**, France, v. 34, p. 549-555, 1999.

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

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 Dom. Animal**, Berlin, v. 41, p. 55–60, 2006.

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

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

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**, New York, v. 68, p. 168-177, 2007.

ERB, R. E.; FLERCHINGER, M. H.; EHLERS, M. H. Metabolism of bull semen. II. Fructolysis relationships with sperm concentration and fertility. **Journal of Dairy Science**, Stanford, 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**, Amsterdam, v. 42, p. 251 – 260, 1996.

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

FREUND I. S.; J. P. MIXNER P. J.; FATHER E. R. Bovine semen metabolism. V. influence of incubation temperature on certain measures of fructolysis, **Journal Series, New Jersey Agricultural Experiment Station**, p. 79-82, 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**, Madison, v. 62, p. 950–958, 2000.

GOOVAERTS, I. G.; HOFLACK, 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**, New York, 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**, New York, v. 41, n. 5, p. 1151-1162, 1994.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de antioxidants na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 509p, 2000.

HALANGK, W.; TUGER, U.; BOCHNENSACK, R. Quantification of aerobic energy turnover in epididymal bull spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, 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**, Philadelphia, v. 124, n. 4, p. 741-750, 1971.

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**, Madson, v. 59, p. 330-337, 1998.

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

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

INSKEEP, P.B.; HAMMERSTEDT, R.H. Changes in metabolism of ram sperm associated whit epididymal transit or induced by exogenous carnitine. *Biology Reproduction*, n.27, p.735-743. 1982.

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

JAISWAL, B. S.; MAJUMDER, G. C. Biochemical parameters regulating forward motility initiation in vitro in goat immature epididymal spermatozoa. **Reproduction Fertility Development**, Collingwood, v. 10, p. 299-307, 1998.

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

JEULIN C; LEWIN L. M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. **Human Reproduction Update**, Vol.2, No.2, p.87-102, 1996.

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

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**, St. Louis, v. 849, p. 307-314, 2007.

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

JONES, R.C. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. **International Journal of Andrology**, New York, v. 22, p. 57 – 67, 1999.

JONES C. R.; DACHEUX J.; NIXON B.; ECROYD W. H. Role of the epididymis in sperm competition. **Asian Journal of Andrology**, China, v. 9, n. 4, p. 493–499, 2007.

KATSKA, L.; RYNSKA, B.; SMORAG, Z. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. **Animal of Reproduction Science**, St. Louis, v. 44, p. 23-31, 1996.

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

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

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

LARDY, H. A. and PHILLIPS H. P. 1941. The effect of certain inhibitors and activators on sperm metabolism. **J. Biol. Chem.** P.138-195, 1941.

LEBOUEF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production et conservation de la semence 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 arabidopsis. **The Plant Cell**, Stanford, v. 15, p. 1990–2002, 2003.

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

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

LU J.; CHEN F.; XU H.; HUANG Y.; LU N. Standardization and Quality Control for Determination of Fructose in Seminal Plasma. **Journal of Andrology**, New York, v. 28, n. 2, 2007.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 2. Glycolysis in spermatozoa. **Biochemistry Journal**, Philadelphia , 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**, Philadelphia, v. 40, n. 4, p. 481-491, 1946.

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

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

MARTINS, J.A.M. **Avaliação da biometria testicular, epididimal e das glândulas sexuais acessórias e correlações entre características biométricas e histológicas em carneiros deslanados sem padrão racial definido (SPRD)**. 2006. 51p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal do Ceará.

MARTINS M.I.M; SOUZA F.F; CHIRINÉA V.H; TEBET J., LOPES M.D. Viabilidade de espermatozoides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. *In: Mostra Científica da FMVZ/UNESP, Anais..... Botucatu-SP, resumo, v. 7, p. 121, 2003.*

MARTINS, C. F.; SILVA, A. E. D. F.; MATARAZZO, R. Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididimal spermatozoa by analysis of motility, acrosomal status, penetration ability in oocytes and integrity of sperm chromatin. **Biology of Reproduction**, Madson, v.62, Supl.1, p.156, 2000.

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, Fortaleza, 2008.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates:the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v.52, p.1273-1280, 2000.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates; the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v. 52, p. 1353-1362, 1999.

MCDONALD, R. Semen dilutors and dilutions. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Gardenville, 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**, Philadelphia, v. 221, p. 559-560, 1984.

MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K. N.; OTT, R. S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n.2, p. 473-475, 1985.

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.

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

MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; HERMANN, A. Transbilayer motion of spin-labelled phospholipids in the plasma membrane of epididymal and ejaculated ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, 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. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**, New York, v. 1033, p. 177-188, 2004.

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

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

PELLICER-RUBIO, M. T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biology of Reproduction**, Madson, v. 27, n. 5, p.1023-1031, 1997.

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

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

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

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.

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

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, 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**, New York, v. 25, n. 2, 2004.

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

SCOTT, T. W.; VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B. P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, Philadelphia, v. 102, p. 456 - 461, 1967.

SIAS B., FERRATO F., PELLICER-RUBIO M., 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 (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Volume 3, p. 169-180, 2005.

SIMPLÍCIO, A. A.; WANDER, A. E.; LEITE, E. R.; LOPES, E. A. Caprino-ovinocultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda. Sobral: Embrapa Caprinos. Documento 48, 44p, 2003.

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

ST JOHN, J.C.; JOKHI, R.P.; BARRATT, C. L.R. The impact of mitochondrial genetics on male infertility. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 65 – 73, 2005.

THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. L. **La Reproduction chez les Mammifères et L'Homme**. INRA, Castanet-Tolosan, 768p. 1991.

UPRETI, G.C.; HALL, E.L.; KOPPENS, D.; OLIVER, J.E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. **Animal of Reproduction Science**, Amsterdam, v. 56, p. 107–121, 1999.

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

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

VIANA, S. K. A.; CHALHOUB, M.; FILHO, R. L. A.; ALMEIDA, K. A.; PORTELA, M. P. A.; BITTENCOURT, F. R.; GONZALEZ, G. S.; ALVES; BITTENCOURT C. C. T.; QUINTELA T. A. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 67-76, 2006.

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

WHITE, I. G. Biochemical aspects of spermatozoa and their environment in the male reproductive tract. **Journal Reproduction Fertility**, Colchester, (Suppl.), v. 18, p. 225-235, 1973.

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

WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre, 2009.