

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**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  
ESTADO DO CEARÁ**

**GYSELLE VIANA AGUIAR**  
Médica Veterinária

**FORTALEZA - CE  
FEVEREIRO – 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**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  
ESTADO DO CEARÁ**

**GYSELLE VIANA AGUIAR**

**FORTALEZA - CE  
FEVEREIRO - 2008**

**GYSELLE VIANA AGUIAR**

**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  
ESTADO DO CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, do qual participam a Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Reprodução Animal

**Comitê de Orientação**

Professor Dr. Airton Alencar de Araújo – Orientador

Professora Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Nascimento Campos

Professor Dr. Arlindo de Alencar Araripe N. Moura

**FORTALEZA – CE  
FEVEREIRO - 2008**

A227e Aguiar, Gyselle Viana

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 Estado do Ceará / Gyselle Viana Aguiar, 2008.

122 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Nascimento

Campos

Co-orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Moura

Área de concentração: Reprodução Animal

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Depto. de Zootecnia, Fortaleza, 2008.

1. Bode 2. Ejaculado 3. Bioquímica 4. Teste de Termorresistência  
I. Araújo, Airton Alencar (orient.) II. Campos, Ana Cláudia Nascimento (co-orient.) III. Moura, Arlindo de Alencar (co-orient.) IV. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia V. Título

CDD 636.08

**GYSELLE VIANA AGUIAR**

**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  
ESTADO DO CEARÁ**

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Zootecnia/ CCA  
Presidente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Nascimento Campos  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Zootecnia/ CCA

---

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura  
Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Zootecnia/ CCA

---

Dr. Diônes Oliveira Santos  
Pesquisador da EMBRAPA / CNPC

---

Prof. Dr. José Ferreira Nunes  
Universidade Estadual do Ceará  
Faculdade de Veterinária

**FORTALEZA  
FEVEREIRO DE 2008**

Aos meus pais, Paulo e Socorro Aguiar e  
irmãos, Jayson, Geysa e Jefferson.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir trilhar todo esse caminho e realizar este trabalho.

A minha família, pelos ensinamentos para toda uma vida, por estar sempre presente e ser meu “porto seguro” para todas minhas realizações pessoais e profissionais. Vocês são responsáveis por tudo que me tornei!

Ao Professor Airton Alencar de Araújo, por me mostrar do que eu sou capaz!

Aos meus co-orientadores Professora Ana Cláudia Nascimento Campos e Professor Arlindo Moura, mestres e amigos.

Ao Professor Dr. José Ferreira Nunes e Dr. Diônes Santos, pela valiosa contribuição na correção deste estudo.

Aos professores Luiz Renato França, Hélio Chiarine e Gleydes Gambogi, pela acolhida e ensinamentos durante minha permanência no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia, ICB/UFMG.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia da UFC, da Pós-Graduação em Biologia Celular da UFMG e do Programa de Cursos de Pós-Graduação da Escola de Veterinária (UFMG), pelos ensinamentos, amizade e por ter tornado a realização este trabalho menos árduo.

Às minhas companheiras de turma, Eva, Irani e Rossana e todos meus amigos e colegas contemporâneos do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia/UFC e PDIZ - UFC/UFPB/UFRPE, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos e colegas do ICB/UFMG, em especial do BIOCEL, do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular (UFMG) e do Programa de Cursos de Pós-Graduação da Escola de Veterinária (UFMG), pelo companheirismo e amizade.

Ao André e Rosângela (UFMG) que possibilitaram o conhecimento de técnicas essenciais para realização deste estudo e todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

Agradeço especialmente ao LERA, que mais que um laboratório, é uma “família”, da qual me orgulho de fazer parte! A realização deste trabalho teria sido impossível sem vocês: Alexandre, Airton, Aline, Ana Cláudia, Ana Gláudia, Andréia, Carlos Eduardo, Elaine, Emanuel, Felipe, Gabriel, Gislaine, Igor, Ítalo, Jameson, Jeane, Josy, Katiane, Kyldary, Mairon, Marcela, Marco Antonio, Michelle, Rafael, Révia, Rubens...

## SUMÁRIO

<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvii</b>
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>1 – Testículos</b> .....	<b>4</b>
<b>2 – Controle hormonal da reprodução no macho</b> .....	<b>4</b>
<b>3 – Espermatozóides epididimários</b> .....	<b>6</b>
<b>4 – Estacionalidade reprodutiva</b> .....	<b>8</b>
<b>5 – Glândulas sexuais anexas e plasma seminal</b> .....	<b>10</b>
<b>6 – Alguns constituintes do plasma seminal</b> .....	<b>14</b>
6.1 – Frutose e ácido cítrico .....	<b>14</b>
6.2 – Proteínas totais .....	<b>16</b>
6.3 – Fosfolipase A <sub>2</sub> (FLA <sub>2</sub> ) e lipases .....	<b>17</b>
6.4 – Alguns minerais presentes no plasma seminal .....	<b>19</b>
<b>7 – Sêmen caprino e sua avaliação</b> .....	<b>20</b>
7.1 – Características físicas do sêmen .....	<b>21</b>
7.1.1 – Volume .....	<b>21</b>
7.1.2 – Cor .....	<b>21</b>
7.1.3 – Aspecto .....	<b>21</b>
7.1.4 – Concentração .....	<b>21</b>
7.1.5 – Motilidade Massal (MM) ou turbilhonamento .....	<b>22</b>

7.1.6 – Motilidade .....	22
7.1.7 – Vigor .....	23
7.2 – Características morfológicas do sêmen .....	23
7.2.1 – Morfologia espermática .....	23
7.3 – Exames complementares do sêmen .....	24
7.3.1 – Teste de termorresistência (TTR) .....	24
<b>8 – Conservação do sêmen caprino .....</b>	<b>25</b>
8.1 – Criopreservação .....	25
8.1.1 – Resfriamento .....	25
8.2 – Diluição do sêmen .....	26
8.2.1 – Diluentes .....	27
8.2.2 – Crioprotetores .....	28
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>46</b>
<b>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 do estado do Ceará .....</b>	<b>46</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>47</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>49</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>2. MATERIAL DE MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
2.1 – Local do experimento e condições experimentais .....	53
2.2 – Animais experimentais .....	53
2.3 – Coleta do sêmen .....	53
2.4 – Análise do sêmen .....	54

2.5 – Teste de termorresistência (TTR) .....	55
2.6 – Morfologia espermática .....	55
2.7 – Avaliação bioquímica do sêmen .....	55
2.8 – Análise estatística .....	56
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
3.1 – Parâmetros seminais .....	57
3.2 – Parâmetros bioquímicos do plasma seminal .....	60
3.3 – Correlações entre os parâmetros seminais e os componentes bioquímicos do sêmen .....	62
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
4.1 – Parâmetros seminais .....	64
4.2 – Parâmetros bioquímicos do plasma seminal .....	67
4.3 – Correlações entre os parâmetros seminais e os componentes bioquímicos do sêmen .....	69
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>83</b>
<b>Atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal de caprino e conservação do sêmen a 4° c em latitude equatorial .....</b>	<b>83</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>84</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>85</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>2. MATERIAL DE MÉTODOS .....</b>	<b>87</b>
2.1 – Local do experimento e condições experimentais .....	87
2.2 – Animais experimentais, coleta e avaliação do sêmen .....	87
2.3 – Determinação da atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> .....	88

2.4 – Análises estatísticas .....	89
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>90</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
4.1 – Efeito do tempo de conservação.....	93
4.2. – Efeito do tratamento.....	93
4.3 – Efeito do grupo .....	94
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>103</b>
<b>Efeito do nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal caprino sobre a viabilidade de espermatozóides epididimários conservados a 4 °C...</b>	<b>103</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>104</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>105</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>2. MATERIAL DE MÉTODOS .....</b>	<b>107</b>
2.1 – Local do experimento e condições experimentais .....	107
2.2 – Animais experimentais .....	107
2.3 – Coleta do sêmen .....	107
2.4 – Castração e coleta dos espermatozóides epididimários .....	108
2.5 – Reconstituição e diluição do sêmen .....	108
2.6 – Resfriamento e avaliação do sêmen .....	109
2.7 – Análises estatísticas .....	109
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>110</b>

<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>115</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>116</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Página

**Tabela 1** – Efeito do tempo de conservação e da época do ano sobre o sêmen caprino, diluído em água de coco com 2,5 % de gema e resfriado a 4 °C durante 48 horas sobre o vigor, a motilidade e a taxa de degradação da motilidade (TDM) ..... **58**

**Tabela 2** - Efeito do tempo de conservação e da época do ano sobre a morfologia espermática no sêmen caprino diluído e resfriado a 4 °C e estocado por 48 horas ..... **58**

**Tabela 3** – Efeito da época do ano (chuvosa ou seca) sobre a concentração de componentes bioquímicos do plasma seminal caprino ..... **60**

**Tabela 4** – Correlações simples de Pearson para os parâmetros seminais do sêmen caprino resfriado a 4 °C e parâmetros bioquímicos do plasma seminal de caprinos coletados em época chuvosa e seca ..... **63**

**Tabela 5** – Correlações simples de Pearson para o nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> com as concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, Ca, P e Mg no plasma seminal de caprinos coletados em época chuvosa e seca ..... **63**

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1** – Efeito da lavagem sobre a conservação do sêmen caprino com alta ou baixa atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal, diluído e resfriado a 4° C e estocado por 48 horas sobre os parâmetros seminais de vigor e motilidade ..... **91**

**Tabela 2** – Efeito da lavagem sobre a conservação do sêmen caprino com alta ou baixa atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal, diluído e resfriado a 4° C e estocado por 48 horas sobre a taxa de degradação da motilidade (TDM) ..... **92**

**Tabela 3** - Efeito da lavagem sobre a conservação do sêmen caprino com alta ou baixa atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal, diluído e resfriado a 4° C e estocado por 48 horas sobre as alterações morfológicas totais (%) ..... **92**

### CAPÍTULO 4

**Tabela 1** – Efeito do nível de atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal caprino em espermatozoides epididimários, diluído em água de coco – 2,5% gema e resfriado a 4° C por 48 horas sobre os parâmetros seminais de vigor, motilidade espermática e taxa de degradação da motilidade (TDM) ..... **111**

**Tabela 2** - Efeito do nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal caprino em espermatozoides epididimários, diluído em água de coco – 2,5% gema e resfriado a 4° c por 48 horas sobre as alterações morfológicas totais (%) ..... **112**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Página

**Figura 1** – Variabilidade individual referente aos parâmetros de: (A) vigor (escala de 0 a 5), motilidade e TDM (0 a 100%) do sêmen caprino resfriado a 4 °C por 48 horas; (B) concentrações de frutose (mg/dL), ácido cítrico (mg/dL) e proteínas totais (g/dL); (C) Ca, P e Mg (mg/dL) e (D) atividade da FLA<sub>2</sub> (U/mL, onde U = μmol de ácido graxo liberado por minuto) ..... **59**

**Figura 2** – Interação dos efeitos indivíduo e época do ano sobre o vigor (A), motilidade (B) e TDM (C) no sêmen caprino diluído e resfriado a 4 °C durante 48 horas. \*p < 0,05 ..... **59**

**Figura 3** – Interação dos efeitos indivíduo e época sobre os parâmetros bioquímicos seminais. Concentrações de: frutose, ácido cítrico, proteínas totais, cálcio, fósforo, magnésio e atividade da FLA<sub>2</sub> do sêmen caprino coletado nas épocas chuvosa e seca do ano. \*p < 0,05 ..... **61**

## RESUMO GERAL

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da época chuvosa e seca do ano sobre a composição do plasma seminal (PS) e os parâmetros seminais de 17 caprinos sem padrão racial definido (SPRD), criados em clima tropical, além de avaliar se a composição bioquímica do PS apresenta correlação com os parâmetros seminais, em função da época do ano, assim como, investigar se o nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) no PS de caprinos pode ser utilizado como indicativo da qualidade espermática e se esse nível exerce influência na preservação dos espermatozoides ejaculados e epididimários quando conservados a 4 °C, por 48 horas. O estudo foi realizado em três etapas: na primeira foram utilizados dezessete machos caprinos e a partir desta, oito bodes com diferentes níveis de atividade de FLA<sub>2</sub> no PS foram selecionados para realização da segunda e terceira etapas. No primeiro experimento durante a época chuvosa e seca, os ejaculados dos animais foram coletados semanalmente, em vagina artificial, para avaliação bioquímica do PS e a cada 14 dias para determinação dos parâmetros seminais. O sêmen foi diluído em água de coco-2,5% gema ( $200 \times 10^6$  spz/mL), resfriado a 4 °C por 48 horas e avaliado o vigor e a motilidade às 2, 24 e 48 horas de resfriamento (T2, T24 e T48), pelo teste de termorresistência lento (TTR). Esfregaços do sêmen diluído foram confeccionados durante o TTR e 200 células foram avaliadas e classificadas morfolologicamente em normais ou anormais. Determinaram-se ainda as concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, Ca, P, MG e nível de atividade da FLA<sub>2</sub>. No segundo experimento, oito caprinos divididos, em função do nível de atividade da FLA<sub>2</sub> no PS em: grupo I (<6,70 U/mL) e o grupo II (>11,00 U/mL). O sêmen foi coletado, diluído e dividido em duas alíquotas: a primeira constituiu o tratamento controle (sêmen não lavado) e a segunda foi centrifugada para remoção do PS (sêmen lavado). No terceiro experimento, o sêmen dos oito animais foi coletado e centrifugado para recuperação do PS e adicionados a alíquotas de um único “pool” de espermatozoides epididimários obtidos de caprinos castrados cirurgicamente. Uma nona alíquota foi adicionada apenas de diluidor (grupo controle). Em seguida, procedeu-se a diluição final em todas as amostras utilizando o mesmo diluidor. No segundo e terceiro experimentos, após a realização dos tratamentos e diluição final, o sêmen foi resfriado a 4 °C por até 48 horas e amostra de cada tratamento foi avaliada pelo TTR às 0 (fresco), 2, 12, 24 e 48 horas de resfriamento.

Esfregaços do sêmen foram confeccionados para avaliação da morfologia espermática. Em todos os experimentos, a qualidade espermática diminuiu à medida que se prolongou o tempo de preservação ( $p < 0,001$ ). No experimento 1, o sêmen apresentou qualidade superior na época chuvosa e também as concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, P e Mg foram maiores nesta época. A FLA<sub>2</sub> apresentou menor atividade na época chuvosa ( $p < 0,05$ ). A concentração de frutose, ácido cítrico e proteínas totais mostraram correlações positivas com o vigor e a motilidade e negativas com a TDM, nas duas épocas. Em relação às alterações morfológicas totais (AMT), a concentração de frutose mostrou correlações negativas, enquanto as de ácido cítrico, proteínas totais e atividade da FLA<sub>2</sub>, positivas. Os níveis de fósforo no PS apresentaram correlação com os parâmetros seminais apenas na época seca, sendo negativa para vigor, motilidade e AMT e positiva para TDM. A concentração de Mg correlacionou-se positivamente com a motilidade na época chuvosa e AMT na seca. No segundo experimento, o tratamento influenciou a qualidade seminal principalmente no grupo I, sendo o desempenho espermático superior no sêmen lavado. O nível de atividade da FLA<sub>2</sub> não afetou a qualidade dos espermatozóides ejaculados, exceto em T48 do sêmen lavado e T24 do sêmen não lavado. Enquanto no terceiro experimento, a adição do PS aos espermatozóides epididimários diminuiu a qualidade espermática e este efeito foi mais pronunciado quando o nível de atividade de FLA<sub>2</sub> foi maior. Contudo, no que se refere a AMT, a adição do PS foi benéfica, reduzindo o número de alterações. Os resultados do presente estudo indicam que caprinos criados em clima tropical apresentam melhor qualidade espermática no período chuvoso, além das concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, P e Mg serem mais elevados nesta época, enquanto a atividade da FLA<sub>2</sub> foi menor neste período. As correlações entre os parâmetros seminais e a composição bioquímica do PS podem indicar que as diferenças detectadas quanto à qualidade espermática entre as épocas do ano deve-se justamente às variações na concentração destes componentes. A presença do PS durante a conservação do sêmen caprino a 4 °C reduziu a qualidade espermática, contudo o nível de atividade da FLA<sub>2</sub> não foi um fator determinante da qualidade seminal para os espermatozóides ejaculados, por isso, não deve ser utilizado como indicativo de qualidade espermática de caprinos criados em região de clima tropical.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate rainy and dry season effect on plasma seminal composition and semen quality of 17 crossbred male goats raised in tropical region and to investigate if the biochemical composition of seminal plasma (SP) is correlated to semen quality in relation to the season of the year. Other objective of this experiment was to evaluate if the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activity level in the SP affects the ejaculate and epididymal spermatozoa. This study was divided into three experiments: in the first phase, seventeen male goats were used and then eight animals with low or high PLA<sub>2</sub> activity in SP were separated to the second and third phases. In the first experiment, the ejaculates were collected in artificial vagina, weekly, the SP was separated to evaluate the biochemical parameters and biweekly for quality semen determination. The sperm was diluted in coconut water added 2,5% of egg yolk ( $200 \times 10^6$  sperm/mL) and stored at 4 °C for 48 hours. The vigor (0-5) and motility (1-100%) were measured at 2, 24 and 48 hours after cooling by thermoresistance test (TRT). Slides of sperm were made during TRT and 200 cells were classified as normal or abnormal cellular morphology. The fructose, citric acid, total proteins, calcium, phosphorus, magnesium level and the PLA<sub>2</sub> activity level in the SP were measured. In the second experiment, eight bucks were separated in two groups according to PLA<sub>2</sub> activity level in SP, in group I (<6.7 U/mL) and group II (> 11.0 U/mL). The semen was obtained by artificial vagina, diluted and separate in two samples: the first aliquot was the control treatment (non-washed semen) and the second aliquot was centrifuged at 550 g for 10 minutes to remove the SP (washed semen). In the third experiment, the semen of the eight bucks was collected and the SP obtained by centrifugation. The SP of each buck was added to aliquots of epididymal spermatozoa pool collected from another male goat and a ninth aliquot was added only to diluent (control). After that, the final dilution ( $200 \times 10^6$  sperm/mL) was made in all samples. In the second and third experiments, after the treatment and final dilution, the semen samples were stored at 4 °C for 48 hours and an aliquot was incubated at 38 °C and evaluated to vigor and motility at 0, 2, 12, 24 and 48 hours of cooling. Slides of sperm were made during TRT and 200 cells were classified as normal or abnormal morphology. In all experiments, the semen quality decreased with time ( $p < 0,001$ ). In the first experiment, the semen obtained in the rainy season was better quality than semen collected in the dry season of the year. In addition, the

fructose, citric acid, total proteins, phosphorus and magnesium levels in the SP were higher in rainy season, while the PLA<sub>2</sub> activity was lower in this period. The fructose, citric acid and total proteins concentration showed positive correlations to vigor and motility in both seasons. The total sperm morphology alterations (TSMA) showed negative correlation with fructose level and positive correlations with citric acid, total proteins concentrations and PLA<sub>2</sub> activity level. In the second experiment, the treatment (washed semen) improved the seminal quality, mainly in washed semen of the group I. The PLA<sub>2</sub> activity level showed no effect on sperm performance in the ejaculate spermatozoa, except at 48h in washed semen and at 24h in the non-washed semen. Finally, in the third experiment, the SP addition on epididymal spermatozoa decreased the seminal parameters and this effect was higher in group II. However, the TSMA were lower when the PLA<sub>2</sub> activity was higher. These results indicated that male goats raised in tropical region showed better seminal quality in the rainy season. In addition, the fructose, citric acid, total proteins, phosphorus and magnesium concentration levels in the SP were higher in rainy season, while the PLA<sub>2</sub> activity was lower in this period. The correlations between the seminal and biochemical parameters in SP could indicate that the differences in the semen parameters in the rainy and dry season occurred due the biochemical parameter variations. The SP addition during the semen storage at 4 °C decreased the seminal quality. However the PLA<sub>2</sub> activity level was not a determinant factor of the seminal quality in the ejaculate spermatozoa. Therefore, it cannot be used as an indicative of the spermatoc quality of male goats raised in tropical region.

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nos dias atuais, a pressão no sentido de um constante melhoramento genético dos rebanhos, com finalidade de incrementar da produção e maximização da exploração animal, é cada vez maior. A inseminação artificial é uma importante ferramenta para o melhoramento genético, já que permite, de forma mais rápida, a multiplicação do material genético de reprodutores com características zootécnicas superiores.

Dessa forma, várias pesquisas têm sido desenvolvidas para obtenção de novas biotecnologias de beneficiamento (NUNES, 1998; PAUW *et al.*, 2003; BITTENCOURT *et al.*, 2006) e conservação do sêmen (TRUMMER *et al.*, 1998; HOLT, 2000; YOSHIDA, 2000; STORNELLI *et al.*, 2005; VIANA *et al.*, 2006), bem como o melhor método (RODRIGUES, 1997), intervalo (AMIR *et al.*, 1986; SHAMSUDDIN *et al.*, 2000) e época do ano para a colheita e preservação do ejaculado (LIMA *et al.*, 1994; CAMPOS *et al.*, 2003b; SANTOS *et al.*, 2006). Além da determinação concentração espermática mais adequada (WATSON, 2000) e diluidor eficiente a ser utilizado (SINGH *et al.*, 1995; NUNES, 1998; GIL *et al.*, 2003; EIMAN & TERADA, 2004; PURBY, 2005) e formas de testar a fertilidade dos reprodutores *in vitro* e *in vivo*, para uma maior pressão na seleção dos mesmos (CHAUNAN & ANAND, 1990; FERRARI *et al.*, 1998; BYRNC *et al.*, 2000).

Testes laboratoriais permitem predizer a capacidade fertilizante de um macho (DAAS, 1992; AMANN & HAMMERSTEDT, 1993; CHEMINEAU *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2006), o que torna muito importante a avaliação andrológica de um reprodutor. Devem ser considerados os aspectos físicos e morfológicos do ejaculado e a composição bioquímica do plasma seminal (RODRIGUES, 1997; CATUNDA, 2007), bem como seus efeitos para o metabolismo e a capacidade fertilizante dos espermatozóides (MANJUNATH & THERIEN, 2002; ZAMIRI & HEIDARI, 2006). Aliado à avaliação física e morfológica do ejaculado, o conhecimento da composição bioquímica do plasma seminal pode indicar variações na atividade do epidídimo ou das glândulas sexuais anexas e no metabolismo dos espermatozóides (KILLIAN *et al.*, 1999; FAN *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2007).

Estudos preliminares demonstraram haver efeito individual do reprodutor sobre a taxa de degradação da motilidade (AGUIAR *et al.*, 2006a) e sobre a composição

bioquímica do plasma seminal, tanto para os componentes minerais (cálcio, fósforo e magnésio), como orgânicos (frutose, ácido cítrico e proteínas totais; CATUNDA, 2007).

Outro fator a ser considerado é a influência das variações ambientais ao longo do ano. Em regiões de clima temperado já está bem definido o efeito do fotoperíodo sobre a atividade reprodutiva de pequenos ruminantes (LEBOEUF *et al.*, 2003; KARAGIANNIDIS *et al.*, 1999). Embora alguns autores cite que em regiões de clima tropical e subtropical, a atividade reprodutiva de pequenos ruminantes estão ligadas ao estado nutricional do animal (DELGADILLO *et al.*, 1997), em regiões próximas à linha do Equador, fatores climáticos como temperatura, umidade relativa do ar, precipitação e irradiação solar provocam alterações nas atividades fisiológicas em caprinos (OGEBE *et al.*, 1996; ACHARYA *et al.*, 1995). O estresse térmico, além de interferir nos parâmetros fisiológicos e ingestão de alimentos (OGEBE *et al.*, 1996), altera também o desempenho reprodutivo dos animais, interferindo na atividade do eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal (RIVER & RIVEST, 1991) prejudicando, conseqüentemente, a função reprodutiva, tendo em vista que a espermatogênese está sob controle fisiológico dos hormônios sintetizados e secretados por estas glândulas (GRIFFIN, 1988).

Dessa forma, levanta-se a hipótese a ser testada: a época do ano exerce influência sobre a composição do plasma seminal (cálcio, fósforo, magnésio, frutose, ácido cítrico e proteínas totais, atividade da FLA<sub>2</sub>) e parâmetros seminais (vigor, motilidade, taxa de degradação da motilidade e morfologia espermáticas) do ejaculado diluído em água de coco e resfriado a 4 °C por até 48 horas de machos caprinos sem padrão racial definido (SPRD) criados na região litorânea do estado do Ceará. Também delineou-se a hipótese de que a composição bioquímica do plasma seminal destes animais apresentar correlação significativa com os parâmetros seminais, em função da época do ano. E mais especificamente que o nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal caprino influencia diretamente a qualidade dos espermatozoides ejaculados e epididimários conservados a 4 °C por 48 horas.

# **CAPÍTULO 1**

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

**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 estado do Ceará**

## **1 - Testículos**

Os testículos são órgãos pares complexos, que possuem dupla função: uma exógena, que é produzir espermatozóides; e outra endógena, a síntese de andrógeno, principalmente a testosterona, responsável pela manutenção da função reprodutiva e aparecimento das características sexuais secundárias (RUSSEL & FRANÇA, 1995). O desempenho reprodutivo do macho depende da habilidade do testículo em promover a espermatogênese, produzindo milhões de espermatozóides viáveis nos túbulos seminíferos e adequados níveis de testosterona, pelas células de Leydig (GIER & MARION, 1970).

O peso testicular do pequeno ruminante pode variar de 80 a 300g, dependendo da espécie, raça, estação do ano e estado nutricional do animal (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Em regiões de clima temperado (latitudes superiores a 35°), ocorrem significativas variações na atividade espermatogênica, que diminui drasticamente durante a estação não reprodutiva (primavera). Estas mudanças estacionais provocam uma redução do peso testicular (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

Em regiões de clima tropical e subtropical, a disponibilidade de alimentos é um dos principais fatores que limitam o desempenho reprodutivo de pequenos ruminantes (NUNES, 2001). Nestas regiões é bem caracterizada a estacionalidade na produção de alimentos, que está relacionada, na maioria das propriedades, com a época chuvosa. A perda crônica de peso do animal provoca uma contínua diminuição da massa testicular e da concentração do número total de espermatozóides no ejaculado (NUNES, 2001). Campos *et al.* (2003a) encontraram uma variação de 96,9 a 112,55 g no peso testicular de bodes sem padrão racial definido (SPRD) entre o período chuvoso e seco, respectivamente.

## **2 - Controle hormonal da reprodução no macho**

O Hipotálamo é o centro regulador da atividade reprodutiva, tanto no macho como na fêmea (BERNE *et al.*, 1998). Este órgão secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é amplamente distribuído no sistema nervoso central (GRIFFIN, 1988). O GnRH é transportado através do plexo capilar da artéria hipofisária superior para alcançar as células-alvo endócrinas específicas da adeno-hipófise

(BERNE *et al.*, 1998), que respondem ao estímulo com liberação de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (GRIFFIN, 1988). Estes dois hormônios estimulam o desenvolvimento e a atividade testicular, fazendo com que tenha início a vida sexual masculina (GRISWOLD, 1993). O início da espermatogênese e o aparecimento da puberdade, que no caprino inicia-se por volta dos 6 a 7 meses (GONZÁLEZ, 2002), são processos associados ao aumento das concentrações de LH, FSH e testosterona (NUNES, 2001; SHARPE, 1994).

As concentrações de testosterona são baixas durante a pré-puberdade e aumentam pouco durante este tempo (AGUIAR *et al.*, 2006b; ELOY & SANTA ROSA, 1998; MOURA & ERICKSON, 1997; CHANDOLIA *et al.*, 1997; EVANS *et al.* 1996), enquanto os níveis de LH estão baixos e mostram alguns pequenos pulsos de maior amplitude (GRIFFIN, 1988). Sugere-se que os baixos níveis de gonadotrofinas na pré-puberdade estão relacionados com a alta sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise ao sistema de “feedback” negativo causado pela testosterona. Um dos pontos principais para iniciação da puberdade é a mudança da sensibilidade hipotalâmica ao “feedback” negativo dos fatores gonadais (GRIFFIN, 1988).

Na puberdade, com a diminuição da resposta inibitória a esses esteróides, ocorre um aumento na secreção de gonadotrofinas, que é suficiente para iniciar a atividade reprodutiva (GRIFFIN, 1988). Durante a puberdade, a secreção de testosterona é caracterizada por episódios pulsáteis, sendo resultado do padrão de secreção do GnRH pelo hipotálamo e de LH pela hipófise. As mudanças na puberdade incluem a maturação das células de Leydig e o início da espermatogênese (NUNES, 2001; SHARPE, 1994).

A testosterona promove o crescimento testicular (ARSLAN *et al.*, 1993) e atua em conjunto com o FSH, tanto para regular a espermatogênese (PARVINEN, 1993), quanto para que a mesma prossiga além dos estágios de espermatócito e de espermátide até espermatozóide (SHARPE, 1994; GUYTON, 1988). Além disso, a diferenciação embrionária das glândulas sexuais acessórias, bem como o crescimento e manutenção da atividade do epitélio secretor é dependente de andrógenos (GONZÁLEZ, 2002). A castração do macho elimina a secreção dessas glândulas, sendo sua função restaurada pela administração de testosterona (STABENFELDT & EDQVIST, 1996).

A testosterona produzida pelos testículos é metabolizada, produzindo compostos androgênicos e estrogênicos (diidrotestosterona e o estradiol), responsáveis pela supressão de LH (GRIFFIN, 1988). Estudos com carneiros têm demonstrado que o estradiol fornece um potente “feedback” negativo ao eixo hipotálamo-hipófise, a ponto

de inibir a produção de andrógenos testiculares, afetando o metabolismo das células intersticiais ou Leydig (GRIFFIN, 1988).

### **3 - Espermatozóides epididimários**

O epidídimo é um órgão alongado, intimamente ligado a cada testículo em sua porção medial (NUNES, 2001) pelo mesoepidídimo e ligamento testicular próprio (CBRA, 1998). Macroscopicamente, é possível dividir o epidídimo em três porções: cabeça, corpo e cauda (DELLMANN & WROBEL, 1982).

O ducto epididimário é um túbulo único, bastante tortuoso e espiralado e compõe o corpo e a cauda do epidídimo (DELLMANN & WROBEL, 1982). Há uma progressiva redução na altura do epitélio e, conseqüentemente, aumento no lúmen do túbulo epididimário, à medida que os espermatozóides se deslocam da cabeça em direção à cauda. Estas alterações histológicas não coincidem com a divisão macroscópica do epidídimo (HAFEZ, 2004).

Características histológicas (KIERSZENBAUM, 2004; HAFEZ, 2004; DELLMANN & WROBEL, 1982) do ducto epididimário sugerem que cada segmento do mesmo desempenha funções específicas no processo de maturação e capacitação dos espermatozóides (DELLMANN & WROBEL, 1982). O epidídimo é responsável pelo transporte, maturação, concentração e armazenamento dos espermatozóides e seus túbulos têm ainda função absorptiva e secretória (WHITE, 1973).

Durante o trânsito epididimário, várias modificações morfológicas ocorrem nos espermatozóides (CAMPOS *et al.*, 2000). Ao deixar o testículo os espermatozóides não são capazes de fertilizar o óvulo, habilidade esta que eles adquirem no epidídimo (GARNER & HAFEZ, 2004).

De acordo com Jindal & Panda (1980), a aquisição de motilidade progressiva é uma das alterações que ocorrem no espermatozóide durante sua passagem pelo epidídimo. Estes autores demonstraram que enquanto apenas 5 a 10% dos espermatozóides localizados na cabeça do epidídimo apresentam movimentos circulares, 60 a 70% destas células na cauda do epidídimo possuem movimentos progressivos.

Contudo, durante sua armazenagem no epidídimo, que se dá principalmente na cauda, onde se localizam cerca de 75% dos espermatozóides epididimários, os gametas masculinos permanecem imóveis, com o metabolismo mais basal possível (WHITE, 1973). Isto se deve ao efeito da proteína imobilina, um fator quiescente, secretado pelas células do epitélio epididimário (GARNER & HAFEZ, 2004). Esta proteína impede que o espermatozóide desperdice suas reservas energéticas antes do momento adequado.

Significativas mudanças na cromatina do núcleo espermático também ocorrem durante o trânsito através do epidídimo (GARNER & HAFEZ, 2004). De fato, Jindal & Panda (1980) observaram um aumento do comprimento da cabeça do espermatozóide localizado na cauda do epidídimo quando comparados àqueles da cabeça deste órgão. A cromatina sofre compactação adicional no epidídimo (GARNER & HAFEZ, 2004).

Outra alteração morfológica que se dá no espermatozóide é a migração da gota citoplasmática da região do colo, deslocando-se caudalmente (JINDAL & PANDA, 1980). A ausência de gota no espermatozóide é de apenas 17% naqueles localizados na cabeça do epidídimo, contra 63% daqueles da cauda (JINDAL & PANDA, 1980). A presença de gotas citoplasmáticas em um número significativo de espermatozóides do ejaculado é sinal de imaturidade destas células (GARNER & HAFEZ, 1980).

A membrana plasmática do espermatozóide também sofre alterações em sua composição, assim como em suas características superficiais (GARNER & HAFEZ, 2004). Estas mudanças devem-se provavelmente às modificações bioquímicas e fisiológicas que se dão durante o trânsito no epidídimo (JINDAL & PANDA, 1980). A habilidade dos espermatozóides sobreviverem por longos períodos no epidídimo pode estar ligada a estas condições bioquímicas (WHITE, 1973).

Os espermatozóides da cauda do epidídimo constituem um excelente modelo experimental para testar os efeitos do plasma seminal, tendo em vista que as células armazenadas na cauda do epidídimo mostram-se maduras, capazes de fertilizar, mas ainda não entraram em contato com a secreção de nenhuma glândula acessória. Desta forma, estas células foram utilizadas para testar a influência da época (chuvosa ou seca) de produção do plasma seminal de bodes criados em região de clima tropical Nordeste do Brasil, sendo observado que, quando comparado com a época chuvosa, o plasma seminal coletado na época do ano seca teve um efeito deletério sobre a sobrevivência e morfologia espermática (CAMPOS, 2003).

Blash *et al.* (2000) testaram a capacidade de fertilização de espermatozóides epididimários *in vivo* e *in vitro* após sua criopreservação em nitrogênio líquido. Os autores observaram que é possível utilizá-los com sucesso depois de sua descongelação, pois testaram a importante possibilidade de preservação do material genético do macho, mesmo depois de sua morte, desde que os espermatozóides da cauda do epidídimo sejam coletados o mais rápido possível.

#### **4 - Estacionalidade reprodutiva**

Como visto anteriormente, o GnRH sintetizado no hipotálamo estimula a secreção de LH e FSH pela hipófise anterior, que são hormônios responsáveis pela atividade normal dos testículos (espermatogênese e síntese de andrógenos) (CHEMINEAU & DELGADILLO, 1993). No entanto, em regiões de clima temperado (latitudes superiores a 35°), onde as variações de duração do dia e da noite a que os animais são expostos são bem marcantes (LEBOEUF *et al.*, 2003; KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000; FABRE-NYS, 2000; CHEMINEAU *et al.*, 1991), a glândula pineal exerce forte controle sobre a atividade gonadotrófica, podendo ter ação positiva ou negativa sobre a liberação de gonadotrofinas (MARKUS *et al.*, 2002; CUNNINGHAM, 1993). Este controle é exercido através da síntese e liberação da melatonina pela glândula pineal, cuja atividade é regulada pelas condições ambientais (duração do dia) (MARKUS *et al.*, 2002; CUNNINGHAM, 1993).

Apesar da glândula pineal ser um órgão endócrino regulado pelo ciclo de iluminação ambiental do dia e da noite, em mamíferos este órgão não é fotossensível, mas um tradutor biológico das informações luminosas ambientais captadas pela retina. Esta glândula transforma um sinal de entrada neural em um sinal de saída hormonal. A pineal e seu principal hormônio, a melatonina, desempenham o papel de sincronizar o ritmo endógeno do organismo ao ciclo claro-escuro ambiental (MARKUS *et al.*, 2002).

A melatonina é produzida exclusivamente no escuro (MARKUS *et al.*, 2002; CUNNINGHAM, 1993). Sua produção e concentração plasmática aumentam consideravelmente durante os dias com curtos períodos de claridade (HAFEZ *et al.*, 2004; MARKUS *et al.*, 2002), típicos de algumas estações do ano, em latitudes superiores a 35°.

Em ovinos e caprinos a melatonina tem uma ação pró-gonadotrófica (MARKUS *et al.*, 2002), estimulando a liberação de LH e FSH, que induz a atividade das gônadas, caracterizando o comportamento destes animais como fotoperíodo negativos (FRABENYNS, 2000; CHEMINEAU *et al.*, 1991). O aumento da liberação de GnRH pelo hipotálamo, e consequente liberação de LH pela hipófise, é básico para o estabelecimento da função testicular em animais púberes ou o restabelecimento da função testicular em animais adultos (STABENFELDT & EDQVIST, 1996).

Em regiões de clima temperado, vários autores têm demonstrado o efeito do ambiente sobre a atividade reprodutiva de caprinos, como o comportamento sexual, composição do plasma seminal, peso testicular, características quantitativas (volume, concentração e número de espermatozóides por ejaculado) e qualitativas do sêmen (vigor, motilidade, termorresistência), bem como as variações plasmáticas dos hormônios que regulam a atividade reprodutiva (LA FALCI *et al.*, 2002; FABRE-NYS, 2000; TULI & HOLTZ, 1995, DELGADILLO *et al.*, 1993; ROCA *et al.*, 1992, CORTEEL, 1977).

Alguns autores afirmam que em regiões tropicais e subtropicais não há efeito da estacionalidade sobre a reprodução de caprinos, desde que estes animais estejam bem alimentados (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Todavia, Delgadillo *et al.* (2001) afirmam que reprodutores da raça Crioula, criados no clima subtropical do norte do México 26° latitude norte, apresentam marcada estacionalidade reprodutiva. Um experimento conduzido nesta mesma região demonstrou que em oito bodes crioulos houve forte efeito da época do ano sobre o peso corporal e testicular e sobre concentrações plasmáticas de testosterona (DELGADILLO *et al.*, 1999). Já Campos (2003), trabalhando com bodes sem padrão racial definido, em clima tropical (3°47' latitude sul), encontrou variação no efeito do plasma seminal coletado em duas diferente épocas (seca ou chuvosa) sobre a sobrevivência e morfologia espermática de espermatozóides coletados da cauda do epidídimo, mesmo com a criação intensiva dos animais doadores do plasma seminal.

Em região de clima tropical, fatores como a temperatura, a disponibilidade de alimentos e as interações sociais funcionam como moduladores do comportamento reprodutivos de caprinos (NUNES, 2001). Entre os fatores ambientais, a temperatura e a umidade relativa do ar exercem importante papel sobre a reprodução (CHEMINEAU, 1986).

O efeito deletério das altas temperaturas na produção espermática ocorre devido a um aumento na temperatura testicular, que provoca degenerações específicas, com surgimento de alterações espermáticas em momentos críticos e precisos do ciclo espermatogênico (NUNES, 2001). A temperatura ambiental a qual os espermatozoides caprinos são afetados situa-se ao redor de 29 a 30 °C, mas a sensibilidade dos bodes à temperatura ambiental varia de acordo com a raça e local de criação (NUNES, 2001)

A eficiência em regular a temperatura corporal é uma característica individual e se repete seja em dias consecutivos ou em diferentes anos (McCRABB *et al.*, 1995). Existe uma variabilidade intra-racial quanto ao estresse térmico, sugerindo uma possível origem genética. A bipartição escrotal, em seus diversos graus leva a uma melhor regulação térmica e tem sido descrita em rebanhos tropicais como adaptação face ao clima adverso (NUNES, 2001).

O aumento da temperatura escrotal predispõe à degeneração do epitélio germinativo, com conseqüente prejuízo na qualidade seminal, uma vez que a espermatogênese sofre influência direta da termorregulação do testículo (VOGLER *et al.*, 1991; COUROT & ORTAVANT, 1981). Estes fenômenos estão relacionados com a redução da fertilidade do macho e causam alterações na expressão protéica das células de Sertoli (IKEDA *et al.*, 1999).

## **5 - Glândulas sexuais anexas e plasma seminal**

O plasma seminal é formado no momento da ejaculação, pela mistura da pequena quantidade de fluído testicular e epididimário e secreções das glândulas anexas (ampolas, glândulas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais) (GONZÁLEZ, 2002). Este líquido fornece um ambiente nutritivo e ionicamente balanceado que contribui para a sobrevivência dos espermatozoides dentro do trato reprodutivo da fêmea (STABENFELDT & EDQVIST, 1996). Contudo, alguns autores também têm descrito que o plasma seminal possui fatores deletérios à sobrevivência espermática (LEBOEUF *et al.*, 2000; PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997; NUNES, 1982).

A composição bioquímica do plasma seminal altera logo após a ejaculação. Há perdas de constituintes intracelulares, aderência de proteínas à membrana dos espermatozoides e aparecimento de substâncias até então inexistentes (MANN & LUTWAT-MANN, 1981).

A contribuição de cada glândula varia entre as espécies, devido à diferença de tamanho dessas glândulas e até mesmo a ausência de algumas delas em algumas espécies (GONZÁLEZ, 2002). Esta composição varia também entre indivíduos de uma mesma espécie e raça, inclusive entre diferentes ejaculados de um mesmo indivíduo (GARNER & HAFEZ, 2004, MANN & LUTWAK-MANN, 1981). De fato, La Falci *et al.* (2002), citam que variações estacionais no controle hormonal da atividade reprodutiva de bodes, devem afetar a secreção das glândulas anexas e consequentemente, a composição bioquímica do plasma seminal.

O fluido testicular participa apenas com uma mínima parte no ejaculado final, já que seu conteúdo é, em sua maior parte, absorvido nos ductos eferentes e na cabeça do epidídimo, além de ser bastante modificado e aumentado pelas glândulas sexuais anexas (WHITE, 1973). O fluido testicular é ativamente secretado pelas células de Sertoli, principalmente em direção ao lúmen dos túbulos seminíferos, onde se transforma num meio de transporte para os espermatozóides no trato genital masculino (RUSSELL *et al.*, 1990).

Apenas 1ml de fluido circula em todo epidídimo do carneiro, em contraste a 40ml de fluido proveniente do testículo, que pode ser coletado da rede testicular, através de sua canulação em animal vivo (WHITE, 1973). A canulação destes órgãos permitiu o conhecimento da composição bioquímica do fluido encontrado nos mesmos. Enquanto na rede testicular o que mais chama atenção é a ausência de glicose e a alta concentração de inositol (100 vezes mais que no plasma sanguíneo). O epidídimo parece contribuir principalmente com a secreção de glicerilfosforilcolina, responsável pela sobrevivência do espermatozóide no epidídimo, além de participar de sua maturação (WHITE, 1973).

Em pequenos ruminantes o corpo da próstata está ausente, sendo encontrada somente a parte interna disseminada ao longo da uretra pélvica, envolvendo-a completamente no caprino (NÚÑEZ, 1993). Devido à presença de outras glândulas secretoras bem desenvolvidas, a contribuição da próstata para a formação do plasma seminal é pequena (WHITE, 1973). No entanto, é conhecido que sua secreção contribui para excitar a motilidade dos espermatozóides (NÚÑEZ, 1993).

As secreções prostáticas incluem os componentes: zinco, frutose, ácido cítrico, colesterol, numerosas proteínas e alguns aminoácidos livres (STABENFELDT &

EDQVIST, 1996). Algumas enzimas como as fosfatases ácidas e alcalinas, enzimas proteolíticas e aminotransferases-aspartato originam-se na próstata (STABENFELDT & EDQUIST, 1996).

As glândulas seminais são glândulas compostas túbulo-alveolar ou tubular, sendo que nos ruminantes é um órgão compacto e lobulado (DELLMANN & WROBEL, 1982), localizadas na superfície dorsal do colo da bexiga, sendo uma de cada lado (NÚÑEZ, 1993).

As glândulas seminais contribuem com a maior parte do volume do plasma seminal e fornece importantes constituintes para a sobrevivência espermática, como a frutose, componente metabolizado a ácido láctico (STABENFELDT & EDQVIST, 1996), é a principal fonte de energia dos espermatozóides (KIERSZENBAUM, 2004).

As vesículas seminais também são responsáveis pela síntese e liberação de sorbitol (facilmente reduzido à frutose), inositol (pode ser utilizado como fonte de carboidrato através de sua conversão à frutose), ácido ascórbico, aminoácidos, proteínas, potássio, lipídios e fosforilcolina (convertida em colina pela ação das fosfatases ácidas e de enzimas proteolíticas; STABENFELDT & EDQVIST, 1996).

Em regiões de clima temperado, durante a estação de monta, o epitélio da glândula seminal é consideravelmente mais espesso quando comparado com o período não reprodutivo (DELLMANN & WROBEL, 1982). Estes dados corroboram com os resultados encontrados por Nunes (1982), que encontrou diferença significativa para o peso e atividade das glândulas seminais de bodes durante a estação de monta. Esta variação na atividade das glândulas seminais está associada com as concentrações plasmáticas de testosterona, já que este órgão é andrógeno dependente (KIERSZENBAUM, 2004).

Já em região de clima tropical, as glândulas seminais não apresentaram variações em seu peso e comprimento ao longo dos distintos períodos: seco e chuvoso (FERNANDES, 1994). Porém, um estudo mais detalhado da histologia destas glândulas, mostrou que durante o período chuvoso, o tecido conjuntivo do parênquima glandular é menos abundante, a altura do epitélio secretor é maior e há um aumento no número e tamanho das vesículas, determinando uma maior atividade nestas glândulas (FERNANDES, 1994). Estes acontecimentos, no entanto, não influenciam de forma acentuada a atividade destas glândulas ao longo do ano (FERNANDES, 1994).

As glândulas bulbouretrais, ou glândulas de Cowper, são duas e estão localizadas na superfície dorso lateral da uretra, em sua porção pélvica, próximo ao arco isquiático (HAFEZ, 2004; NÚÑEZ, 1993). São órgãos compactos no bode e possuem secreção de natureza mucosa (MIES FILHO, 1982) e rica em proteína (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Nos ruminantes, a secreção destas glândulas é lançada à uretra antes da ejaculação, para neutralizar e lubrificar a mesma (DELLMANN & WROBEL, 1982).

Durante a estação não reprodutiva, as glândulas bulbouretrais hipertrofiam e aumentam sua atividade, sob influência das altas concentrações plasmáticas de prolactina, e produzem mais fosfolipase A (NUNES, 1982). Já no Estado do Ceará, em região de clima tropical, não foi observado diferenças significativas para o peso e o comprimento das glândulas bulbo uretrais entre os períodos seco e chuvoso (FERNANDES, 1994).

Os efeitos negativos da secreção das glândulas bulbouretrais parecem ser parcialmente inibidos pela secreção das glândulas vesiculares. Nunes (1982) demonstrou que a adição de secreção das glândulas bulbouretrais em espermatozóides epididimários diluídos de leite desnatado provocou reação acrossômica em 95% das células, enquanto, a secreção da glândula seminal teve este efeito em apenas 5% das células e uma mistura da secreção das duas glândulas (1:1) afetou cerca de 27% dos espermatozóides.

Yamashiro *et al.* (2006), tentando diminuir o efeito do PS sobre os espermatozóides de caprinos, coletaram o ejaculado em tubos já contendo diluidor e observaram uma melhora significativa sobre a motilidade espermática e integridade acrossômica. Sugerindo que as características funcionais *in vitro* são abruptamente modificadas pelo contato rápido com o fluido das glândulas acessórias na ejaculação.

Há várias controvérsias sobre o papel do plasma seminal, já que em algumas espécies, inclusive no caprino, é possível induzir a gestação com inseminação realizada com espermatozóides coletados da cauda do epidídimo (GARNER & HAFEZ, 2004; BLASH *et al.*, 2000). Talvez o principal motivo do questionamento da função do plasma seminal seja devido à grande diferença de sua composição entre as espécies (GARNER & HAFEZ, 2004, GONZÁLEZ, 2002).

A retirada do plasma seminal, por lavagem do sêmen, logo após a coleta do ejaculado, seguida de diluição em meio à base de leite desnatado, aumentou significativamente a sobrevivência dos espermatozóides congelados e descongelados e

incubados a 37 °C por 120 minutos (CORTEEL, 1974, CORTEEL, 1975). Este efeito se deve a algum componente do plasma seminal, já que a retirada do mesmo melhorou o desempenho do sêmen (CORTEEL, 1975).

A composição do plasma seminal em mamíferos deve-se à quantidade de órgãos que participam da sua produção, bem como a variação de absorção e secreção de fluidos em diferentes órgãos, que altera sua bioquímica (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). A frequência de coleta é outro fator que influencia a composição do plasma seminal (MANN & LUTWAK-MANN, 1981), principalmente quando a coleta é realizada com o uso de eletro-ejaculador, já que a posição dos eletrodos pode estimular de forma diferente as glândulas sexuais acessórias (GONZÁLEZ, 2002). A análise da composição de diferentes ejaculados de um mesmo animal não irá produzir perfis bioquímicos idênticos (MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

Apesar da grande variedade de substâncias na composição do plasma seminal, pouco se sabe sobre a função específica de cada um deles (GONZÁLEZ, 2002).

## **6 - Alguns constituintes do plasma seminal**

### **6.1 - Frutose e Ácido Cítrico**

Em ruminantes o sêmen é caracterizado por altos níveis de frutose e ácido cítrico por mililitro (ROCA *et al.*, 1993). Estas substâncias são importantes fontes de energia para o metabolismo dos espermatozóides, além de possuírem função tamponante (MANN, 1974). Estes componentes possuem correlação direta entre si ( $r = 0,60$ ,  $p < 0,01$ ) e com o pH seminal ( $r = 0,39$  e  $r = 0,35$ , para a frutose e ácido cítrico, respectivamente;  $p < 0,01$ ) (ROCA *et al.*, 1993).

Com a finalidade de estudar o metabolismo da célula espermática, 192 ejaculados, provenientes de quatro carneiros, foram incubados por 90 minutos a 37 °C em banho-maria. Foi demonstrado que logo nos primeiros 30 minutos de incubação, a frutose foi degradada, enquanto a concentração de ácido cítrico não apresentou variação até os 90 minutos (GONZALES *et al.*, 1984). Sugere-se, com este resultado que a frutose é a principal substrato energético dos espermatozóides, enquanto o ácido cítrico, pelo menos até 90 minutos após a ejaculação, não é utilizado no metabolismo espermático (GONZALES *et al.*, 1984).

O ácido cítrico comporta-se como um ativador da fosfatase ácida, sendo importante para a manutenção do equilíbrio osmótico, juntamente como o potássio e o sódio, favorecendo, deste modo, à atividade espermática (IBARRA & NAVARIDAS, 1992).

A frutose é o principal açúcar presente no sêmen (GONZÁLEZ, 2002; MANN & LUTWAT-MANN, 1981; MANN & LUTWAT-MANN, 1948). Este carboidrato funciona como marcador da atividade das vesículas seminais e é necessário à motilidade inicial do espermatozóide (IBARRA & NAVARIDAS, 1992). A formação da frutose na vesícula seminal depende essencialmente de duas vias metabólicas, ambas a partir da glicose sanguínea: uma via fosfatase da glicose ou frutose e outra via sorbitol (MANN, 1974). O espermatozóide tem capacidade de realizar frutólise por via aeróbica ou anaeróbica, produzindo ácido láctico e energia (RODGER, 1975; MANN & LUTWAT-MANN, 1948).

Em aerobiose, a frutólise não é a única via de obtenção de energia do espermatozóide, que mesmo se privado de frutose, pode sobreviver na presença de O<sub>2</sub> 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).

A célula espermática também é capaz de utilizar a glicose como substrato energético, porém esse açúcar está em concentrações bem menores no plasma seminal (GONZALEZ, 2002; MANN & LUTWAT-MANN, 1981), metabolizando este carboidrato aeróbica ou anaerobicamente (MANN & LUTWAT-MANN, 1948).

Há marcada diferença na concentração de frutose no plasma seminal, com diferença entre as espécies e indivíduos (MANN & LUTWAT-MANN, 1948). O nível de frutose no plasma seminal depende da contribuição relativa das diferentes glândulas anexas do trato reprodutivo do macho (MANN & LUTWAT-MANN, 1981). Espécies com alta concentração espermática possuem, proporcionalmente, menos frutose por ejaculado, o que em bovinos e caprinos varia em torno de 500 a 1000mg/dL (MANN & LUTWAT-MANN, 1981). Em região de clima tropical, para 20 caprinos sem padrão racial definido, foi encontrada uma média anual de 560 mg/dL (CATUNDA, 2007).

Vários fatores são capazes de influenciar a concentração de frutose no plasma seminal caprino. Já foi anteriormente descrito efeito de época, tanto em regiões de clima temperado (ROCA *et al.*, 1993) quanto em clima tropical (CATUNDA, 2007; PINHEIRO *et al.*, 1996a), efeito de indivíduo (CATUNDA, 2007); efeito de coleta, em

um mesmo animal (MANN & LUTWAT-MANN, 1948), do método de coleta (RODRIGUES, 1997) e do tempo de incubação do sêmen em banho-maria a 37 °C (GONZALES *et al.*, 1984; MANN, 1946). Também foi observado efeito de época e indivíduo para a concentração de frutose no plasma seminal de carneiro (GIRÃO & MIES FILHO, 1989).

Em animais domésticos de produção, o ácido cítrico é derivado principalmente da secreção vesicular (MANN & LUTWAT-MANN, 1981), sendo sua produção andrógena dependente e sujeita às variações sazonais (GONZÁLEZ, 2002). Para 20 caprinos criados em região de clima tropical, foi descrito uma média anual de aproximadamente 460 mg/dl (CATUNDA, 2007), sendo que esta concentração pode sofrer efeito de época (CATUNDA, 2007; PINHEIRO *et al.*, 1996a; ROCA *et al.*, 1993), indivíduo (CATUNDA, 2007) e método de coleta (RODRIGUES, 1997).

Estas diferenças nas concentrações frutose e ácido cítrico no plasma seminal podem ocorrer não somente devido à variação genética, mas também devido a influencia ambiental, ao método de coleta do sêmen e frequência das ejaculações (ROCA *et al.*, 1993). A variação no tamanho e atividade das glândulas anexas pode explicar o efeito do indivíduo sobre a concentração dos componentes bioquímicos do plasma seminal (GONZÁLEZ, 2002).

## **6.2 - Proteínas Totais**

A vesícula seminal e a próstata contribuem juntas para a produção de proteínas do plasma seminal (MANN & LUTWAT-MANN, 1981). Em animais domésticos, algumas destas proteínas são rapidamente metabolizadas, logo após a ejaculação, sob efeito de enzimas, sendo reduzidas a aminoácidos e peptídeos (MANN & LUTWAT-MANN, 1981; MANN, 1974).

O número de diferentes tipos de proteínas no plasma seminal, assim como sua concentração é bastante variável. A maioria das proteínas do plasma seminal tem entre quatro a dez subunidades e a quantidade de cada uma varia de individualmente (CATUNDA, 2007; MANN & LUTWAT-MANN, 1981). Foi observado ainda efeito de época do ano, em clima subtropical (LA FALCI *et al.*, 2002) e tropical (CATUNDA, 2007).

A variação da concentração de certos componentes do plasma seminal, provavelmente proteínas, pode ser responsável pelos diferentes efeitos da presença do

plasma seminal sobre a capacidade fertilizante dos espermatozóides (MAXWELL & JOHNSON, 1999).

Em bovinos, o perfil protéico do plasma seminal permitiu prever a capacidade fertilizante dos espermatozóides. Assim, aqueles touros com maior concentração de proteínas com alto peso molecular no plasma seminal, mostraram-se mais férteis que aqueles com maior concentração de proteínas de baixo peso molecular (KILLIAN, *et al.*, 1999).

As proteínas exercem múltiplos efeitos sobre a função espermática, desempenhando um importante papel na capacitação dos espermatozóides (DESNOYERS & MANJUNATH, 1992; BARRIOS *et al.*, 2000). Em touros da raça Holandesa, de fertilidade comprovada, foi descrito vários grupos de proteínas presentes nos fluídos das glândulas anexas, sendo as mesmas responsáveis por diferentes papéis na qualidade espermática (MOURA *et al.*, 2007). Estes mesmos autores citaram que estas proteínas estão envolvidas com os processos de capacitação espermática, proteção da membrana do espermatozóide, reação acrossômica e interação com a membrana do ovócito e motilidade espermática.

### **6.3 - Fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) e lipases**

Em bodes, as glândulas bulbouretrais secretam grandes quantidades de proteínas com atividade de lípase e fosfolipase. Originalmente, identificada como enzima coaguladora da gema de ovo, a EYCE (“egg yolk-coagulating enzyme”) foi descrita por Roy (1957). Esta enzima catalisa a hidrólise das lecitinas presentes na gema de ovo (um dos constituintes utilizados em diluentes de sêmen) em ácidos graxos e lisolecitinas. Este último componente, em grandes quantidades, é tóxico para sobrevivência dos espermatozóides (ROY, 1957). Esta é uma particularidade que limita o uso de gema de ovo, um protetor mecânico da membrana espermática, em diluentes para sêmen de bodes (NUNES, 1982).

Posteriormente, foi proposto que esta enzima pesava entre 40 a 60 KDa e era realmente secretada pela glândula de Cowper (NUNES, 1982). Anos depois, Pellicer-Rubio *et al.* (1997) purificaram a BUSgp60 da secreção da bulbouretral e demonstraram que esta proteína tem 50 a 70% homologia com lipases pancreáticas, com capacidade de hidrolisar os triglicérides do leite desnatado (utilizado como diluidor de sêmen) em ácido oléico, substância deletéria aos espermatozóides. Mais recentemente, um

sequenciamento de um clone de DNA desta proteína confirmou que a mesma pertence realmente à família das lípases pancreáticas, mais especificamente à subfamília das proteínas 2 relacionadas às lípases pancreáticas (PLRP<sub>2</sub> – pancreatic-lípase-related protein 2), com grande similaridade com a PLRP<sub>2</sub> de cavalos. Dessa forma, foi proposto o nome GoPLRP<sub>2</sub>, para essa proteína específica nos caprinos (SIAS *et al.*, 2005).

A GoPLRP<sub>2</sub> é um polipeptídeo com 452 aminoácidos, possui massa molecular de 50,242 KDa, com sequência de aminoácidos idênticas às observadas em outras lípases pancreáticas (SIAS *et al.*, 2005). Estes mesmos autores demonstraram que esta proteína apresenta atividade tanto de lípase, como de fosfolipase.

As fosfolipases A<sub>2</sub> são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação acil-éster, na posição sn-2 de fosfoglicerídeos. Esta reação libera quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. De modo geral a ativação da FLA<sub>2</sub> depende de sua interação com grandes agregados lipídicos, em interfaces de lipídeo/água, o que permite a difusão do substrato para o sítio ativo (CHACUR, 2004). Ainda segundo este autor, diversas fosfolipases A<sub>2</sub> têm sido identificadas, baseado na localização, regulação, sequência de gene e estrutura. Atualmente, as fosfolipases A<sub>2</sub> estão divididas em 12 grupos, com base na estrutura primária e na presença de pontes dissulfídicas intramoleculares.

As FLA<sub>2</sub> dos grupos I, II, III, V, IX, X, XI e, mais recentemente, do grupo XII, utilizam como unidade catalítica a histidina na posição 48 e o aspartato na posição 99. Estas FLA<sub>2</sub> requerem quantidades milimolares de cálcio para a catálise e são também denominadas FLA<sub>2</sub> secretadas (sFLA<sub>2</sub>). Por outro lado, as enzimas dos grupos IV, VI, VII e VIII utilizam a serina 228 como sítio catalítico, e não requerem cálcio para atividade enzimática (CHACUR, 2004).

Em regiões de clima temperado, há um significativo efeito individual do bode em relação ao efeito da fosfolipase A. Sua atividade depende da presença de cálcio, de pH ótimo, temperatura, concentração da mesma no plasma seminal, estação do ano e até mesmo da espécie de ave que fornece a gema de ovo para o preparo do diluente (CHEMINEAU *et al.*, 1991, MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

Foi anteriormente descrito efeito de época sobre a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> em região de clima temperado (SIAS *et al.*, 2005; NUNES, 1982), e subtropical (LA FALCI *et al.*, 2002). Porém, estes autores descreveram épocas diferentes para a ocorrência de maior atividade desta enzima. Sias *et al.* (2005) relataram atividade da FLA<sub>2</sub> durante a estação reprodutiva, enquanto outros autores observaram esse

comportamento durante a estação não reprodutiva (LA FALCI *et al.*, 2002; NUNES, 1982). Não há dados na literatura sobre a atividade da FLA<sub>2</sub> no sêmen de caprinos criados em região de clima tropical.

#### **6.4 – Alguns minerais presentes no plasma seminal**

Ao contrário de outros nutrientes, os minerais não podem ser sintetizados pelos organismos vivos, sendo as suas principais funções: a composição de órgãos e tecidos, constituintes de tecidos e fluidos corporais como eletrólitos e catalisadores em sistemas hormonais e enzimáticos (SENGER, 2002). Entre os principais minerais encontrados no plasma seminal, podemos citar o sódio, cloro, potássio, zinco, cálcio, magnésio e fósforo (MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

Em espermatozóides touro foi observada uma variação na concentração de cálcio intra e extracelular e esta característica é capaz de prever a fertilidade do reprodutor *in vivo* (BAILEY *et al.*, 1994). Estes autores demonstraram que o fluxo de cálcio pela membrana espermática está relacionado à capacidade fertilizante dos espermatozóides. Células com menor concentração de cálcio no momento da ejaculação e maior capacidade de mantê-la baixa, apresentam maior fertilidade *in vivo*. O processo de criopreservação parece comprometer negativamente a habilidade do espermatozóide em expulsar o cálcio para o meio extracelular, com conseqüente comprometimento de sua capacidade fertilizante (BAILEY *et al.*, 1994). Isto sugere o papel regulador do cálcio sobre a motilidade e fertilidade dos espermatozóides.

Em ovinos, a concentração de íons sódio, cloreto e fosfato no plasma seminal excederam àquelas da célula espermática, enquanto a de potássio, cálcio e magnésio são maiores no meio intracelular (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000). Estes mesmos autores descreveram que concentrações mais altas de potássio e cálcio no espermatozóide causam redução na atividade espermática em ovinos nativos e Merinos. Os dados também sugerem uma relação recíproca entre o conteúdo intracelular de potássio, cálcio e fósforo com relação à percentagem de espermatozóides vivos. Uma percentagem mais alta de células vivas foi associada com altas concentrações de íons potássio e cálcio e baixa de fosfato (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000).

A elevada quantidade de íons  $PO_4^-$  no plasma seminal revela a atividade da fosfatase alcalina em liberar íons a partir dos processos metabólicos dos espermatozóides (DHAMI & SAHNI, 1993).

Pinheiro *et al.* (1996b) descreveram efeito de época do ano e raça sobre as concentrações plasmáticas de Ca, P e Mg. Estes autores sugeriram que as variações da concentração destes minerais no plasma seminal caprino devem-se à diferença de disponibilidade e qualidade do alimento entre as épocas chuvosa e seca, exercendo influência sobre o equilíbrio eletrolítico do sêmen dessa espécie. Na espécie ovina, também foi observado o efeito de raça sobre a composição mineral do plasma seminal (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000).

Foi descrito ainda efeito de indivíduo e época sobre as concentrações destes minerais (CATUNDA, 2007). Outro fator que pode afetar a concentração de minerais no plasma seminal é a frequência de coleta. Kaya *et al.* (2002) observaram que o aumento na frequência de coleta de sêmen em ovinos provocou o aumento da concentração de potássio e sódio no plasma seminal e redução das concentrações de cálcio e magnésio.

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

## **7 - Sêmen caprino e sua avaliação**

O sêmen caprino consiste de uma suspensão de espermatozóides no plasma seminal, que é composto pelas secreções do próprio testículo, do epidídimo e das glândulas anexas. Todos estes componentes se misturam no momento da ejaculação (GONZÁLEZ, 2002; NUNES, 2001).

O sêmen do bode possui características físicas e bioquímicas específicas, que podem variar mesmo dentro da espécie caprina, dependendo da raça e do indivíduo, da idade do mesmo, da época e método (vagina artificial ou eletro-ejaculador) de coleta, da alimentação do animal (CORTEEL, 1977), e do número de coletas a que o animal é submetido (MIES FILHO, 1987).

## **7.1 – Características físicas do sêmen**

### **7.1.1 – Volume**

O volume do ejaculado do bode varia de 0,2 a 2,0 ml (MIES FILHO, 1987). No nordeste do Brasil, foi encontrado volume médio de 0,35 ml para bodes da raça Moxotó (NUNES *et al.*, 1983). Para as raças Alpina, Anglo Nubiano e Canindé Enquanto, na mesma região, foi obtido volume médio de 0,6 ml, com variações de 0,2 a 1,8ml (VILLAR FILHO *et al.* 1993).

### **7.1.2 – Cor**

A cor deve ser amarela para sêmen caprino (NUNES *et al.*, 1997, MIES FILHO, 1987). Porém, a tonalidade pode ser alterada de acordo com a concentração espermática do ejaculado. Sêmen com coloração avermelhada, marrom e cinza, são indicativos de sangue vivo, sangue hemolisado e sujeira respectivamente (CBRA, 1998) e a cor esverdeada indica pus (MIES FILHO, 1987).

### **7.1.3 – Aspecto**

O aspecto é de crucial importância na avaliação do sêmen, pois é indicativo da concentração de espermatozóides no ejaculado (MIES FILHO, 1987). Normalmente, o aspecto apresenta-se de leitoso a cremoso, sendo que o último deve-se à grande concentração de células espermáticas (MIES FILHO, 1987). O sêmen com aspecto turvo ou aquoso deve ser desprezado, devido a sua baixa concentração (NUNES *et al.*, 1997).

### **7.1.4 – Concentração**

A concentração do ejaculado de bodes varia de 1 a  $5 \times 10^9$  espermatozóides/ml (MIES FILHO, 1987), sendo que, de acordo com Nunes *et al.*(1997), a concentração de 3 bilhões é o usualmente encontrado. Em 120 coletas, de 24 machos caprinos das raças Alpina, Anglo Nubiano e Canindé foi observado uma variação de 0,54 a  $7,65 \times 10^9$  spz/ml, com uma média de  $2,98 \times 10^9$  spz/ml (VILLAR FILHO *et al.*, 1993). Já para

caprinos da raça Moxotó, foi obtida concentração próxima de quatro bilhões de espermatozóides por ml (NUNES *et al.*, 1983).

A concentração pode ser avaliada pelo método direto, de apreciação visual do ejaculado (CHEMINEAU *et al.*, 1991; MIES FILHO, 1987), levando em consideração o aspecto e atribuindo valores de número de espermatozóides (MIES FILHO, 1987). Porém, este método é muito impreciso devido à avaliação subjetiva (CHEMINEAU *et al.*, 1991). A câmara hematocitométrica é uma técnica de alta precisão, se realizada de forma adequada (CHEMINEAU *et al.*, 1991). E o aparelho de espectrofotômetro é outro método eficiente, rápido e de alta precisão, contudo, trata-se de um aparelho caro e precisa ser calibrado com a utilização da câmara hematocitométrica (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

#### **7.1.5 – Motilidade Massal (MM) ou Turbilhonamento**

O movimento de massa ou turbilhonamento consiste do movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen puro sobre uma lâmina, com o auxílio do microscópio. Este parâmetro deve ser avaliado rapidamente, pois a esta temperatura a mobilidade rapidamente, em 15 a 20 segundos (CHEMINEAU *et al.*, 1991). A intensidade do movimento é resultante da motilidade, do vigor e da concentração (CBRA, 1998), porém esta avaliação não é suficiente para detectar a percentagem de espermatozóides móveis, bem como seu vigor (CHEMINEAU *et al.*, 1991). De acordo com estes mesmos autores, ao sêmen deve ser atribuído uma nota de 0 (ausência de movimento) a 5 (forte movimento de ondas).

#### **7.1.6 – Motilidade**

A motilidade espermática expressa a percentagem de espermatozóides móveis e assim com a motilidade massal, é uma avaliação subjetiva (CBRA, 1998). Para uma correta avaliação o sêmen deve estar diluído a uma concentração de 60 a  $200 \times 10^6$  spz/ml (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Deve pôr uma gota de sêmen diluído sobre uma lâmina a 37 ou 38 °C e cobri-la com lamínula, e observar em microscópio ótico, utilizando um aumento de 100 a 400× (CBRA, 1998).

### **7.1.7 – Vigor**

O vigor representa a força do movimento que também influencia a velocidade com que os espermatozóides se movimentam (CBRA, 1998). Ao vigor é atribuído uma nota subjetiva, que depende do examinador, de 0 (ausência de deslocamento dos espermatozóides) a 5 (deslocamento rápido e flechante do espermatozóide).

## **7.2 - Características morfológicas do sêmen**

### **7.2.1 – Morfologia espermática**

A morfologia espermática é outra característica importante a ser avaliada, que fornece conhecimento consistente da qualidade seminal por determinar a percentagem de espermatozóides anormais no ejaculado (CHEMINEAU *et al.*, 1991). Um dos métodos utilizados para avaliação da morfologia espermática é a confecção de esfregaços corados de espermatozóides com corantes vitais (CBRA, 1998, NUNES *et al.*, 1997; CHEMINEAU *et al.*, 1991; MIES FILHO 1987). Posteriormente deve-se proceder com a contagem de 200 células por esfregaço, com aumento de 1000× (imersão) em microscópio ótico.

As anormalidades espermáticas podem ser classificadas segundo Colas (1980), em:

- Defeito de cabeça;
- Defeito de peça intermediária;
- Gota citoplasmática proximal;
- Gota citoplasmática distal;
- Defeito de flagelo.

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) é o órgão que regulamenta o exame andrológico e a avaliação do sêmen animal no Brasil e em seu manual, elaborado em 1998, conforme convênio com o Ministério da Agricultura, preconiza que o sêmen caprino, para ser utilizado deve obter, no mínimo, os seguintes padrões seminais:

Bodes doadores de sêmen (valores pós-descongelamento, palhetas de 0,25ml):

Parâmetro	Nota
Motilidade .....	30%
Vigor .....	2
Total de espermatozóides normais .....	80% (máximo de defeitos primários: 10%)
Número de espermatozóides com motilidade progressiva .....	$40 \times 10^6$ spz/ml por dose

### 7.3 – Exames complementares do sêmen

#### 7.3.1 – Teste de termorresistência

Depois de depositado no trato genital feminino, seja por monta natural ou por inseminação artificial, os espermatozóides levam algumas horas para encontrar o óvulo e realizar a fecundação. Desta forma, a capacidade fertilizante do espermatozóide está ligada à sua habilidade em sobreviver por algum tempo horas no aparelho reprodutor da fêmea (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

Neste sentido foi criado o teste de termorresistência (TTR), que avalia *in vitro* a capacidade de sobrevivência do espermatozóide a uma temperatura de 37 ou 38 °C (imitando a temperatura do trato genital feminino) (CHEMINEAU *et al.*, 1991). No entanto, a metodologia para realização deste teste varia entre as espécies (CBRA, 1998) e do tipo de sêmen utilizado (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

Para o bode é utilizada a incubação do sêmen, em banho-maria a 37 °C, por duas horas e a avaliação da motilidade e vigor é realizada aos 5, 60 e 120 minutos após o início da incubação (CAMPOS, 2003; CHEMINEAU *et al.*, 1991). O CBRA preconiza que, para sêmen descongelado o vigor e a motilidade mínima deve ser de 2 e 30%, respectivamente, na avaliação aos 5 minutos de incubação.

Seguido a realização do TTR, a taxa de degradação da motilidade (TDM) é calculada, utilizando-se a seguinte fórmula:

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

## **8 – Conservação do Sêmen Caprino**

### **8.1- Criopreservação**

O objetivo da conservação do sêmen em estado líquido (por pouco tempo) ou em estado sólido (por tempo prolongado) é prolongar a capacidade de fertilização dos espermatozoides, reduzindo temporariamente suas atividades metabólicas e motilidade (SALAMON & MAXWELL, 1995; EVANS & MAXWELL, 1990). A técnica de preservar os espermatozoides a baixas temperaturas, por tempo prolongado, deve ser aplicada com cuidado, observando alguns detalhes, visto que o choque térmico, causado por rápidas variações de temperatura, pode causar danos irreversíveis à membrana plasmática (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Vários fatores inerentes ao processamento do sêmen podem afetar a taxa de fertilidade posterior à inseminação artificial (IA). Entre elas podemos citar a composição do diluente utilizado, temperatura e tempo de preservação, taxa de diluição e dose inseminante (SALAMON & MAXWELL, 2000).

#### **8.1.1 – Resfriamento**

O método de resfriamento consiste na redução da temperatura de diluição do sêmen até 15 ou 4 a 5 °C, mantendo a esta temperatura até o momento de ser utilizado (EVANS & MAXWELL, 1990). Essa queda de temperatura deve ser realizada de forma gradual, principalmente entre 18 e 5 °C, faixa em que os espermatozoides são mais sensíveis ao choque térmico (EVANS & MAXWELL, 1990). Essa redução deve ser

numa taxa de 0,5 °C por minuto, levando cerca de 1,0 a 1,5 horas para o resfriamento a 15 °C e 2 a 3 horas até 4 °C, dependendo da temperatura de diluição.

Uma vez tendo atingido essa temperatura, sua manutenção é importantíssima, já que temperaturas superiores não são suficientes para inibir fortemente o metabolismo espermático; temperaturas abaixo de 0 °C são letais para os espermatozóides (EVANS & MAXWELL, 1990).

A temperatura de resfriamento depende do diluente utilizado: para diluidor a base de água de coco recomenda-se resfriamento a 4 °C e para sêmen diluído em leite deve-se resfriar a 15 °C (ARAÚJO & CAMPOS, 2005). E da temperatura de resfriamento depende o tempo de conservação: a 4 °C o tempo máximo de conservação máxima do sêmen é de 48h (NUNES *et al.*, 1997; EVANS & MAXWELL, 1990), enquanto diluído em leite e resfriado a 15 °C o mesmo deve ser usado em 6 às 12h (EVANS & MAXWELL, 1990).

Independente do diluente, temperatura ou condição de armazenamento, ocorre prejuízo à célula espermática à medida que aumenta o tempo de estoque, sendo que as principais mudanças que se observa neste período é a redução da motilidade e da integridade das células espermáticas (SALAMON & MAXWELL, 2000). Estas mudanças podem contribuir para o acúmulo de substâncias tóxicas, produto do metabolismo, formadas a partir da peroxidação dos lipídios da membrana dos espermatozóides (SALAMON & MAXWELL, 2000). Desta forma, a fertilidade de ovelhas diminui na ordem de 10 a 35% por dia de conservação sob resfriamento (EVANS & MAXWELL, 1990).

## **8.2 – Diluição do sêmen**

Uma das maiores vantagens da IA dá-se pelo fato da maximização da utilização de um reprodutor de alto valor genético, visto que com um único ejaculado é possível fertilizar um maior número de fêmeas quando comparado à monta natural (MIES FILHO, 1987).

No entanto, tecnicamente, para que o ejaculado de um dado reprodutor seja utilizado em concentrações adequadas, com número suficiente de espermatozóides na

dose inseminante, faz-se necessário que o mesmo seja diluído, aumentando o volume de sêmen a ser manipulado (EVANS & MAXWELL, 1990). De acordo com estes mesmo autores, há também uma razão biológica para o uso de diluentes, já que estes proporcionam aos espermatozóides um ambiente com osmolaridade e pH adequados, suprem-nos com nutrientes, além de servir como protetores para as variações de temperatura durante a criopreservação.

A diluição deve ser realizada o mais rapidamente possível após a coleta e avaliação do sêmen. O diluente deve estar à mesma temperatura do sêmen e por isso se recomenda realizá-la em banho-maria a 30 °C (EVANS & MAXWELL, 1990) ou 32 °C (ARAÚJO & CAMPOS, 2005). Deve-se sempre acrescentar o diluente ao sêmen e nunca o contrário (EVANS & MAXWELL, 1990).

Um bom diluente deve ser atóxico para as células espermáticas, ter pH e osmolaridade compatível com a sobrevivência destas células, ser barato e de fácil preparo (NUNES, 2001; NUNES *et al.*, 1997). Dentre os vários diluidores podemos destacar a água de coco, o leite e o Tris (hidroximetil aminometano).

Outros componentes podem ser adicionados aos diluidores para melhorar seu desempenho, como os crioprotetores (gema de ovo e glicerol), açúcares (glicose, frutose e sacarose), sais (citrato de sódio) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) (SALAMON & MAXWELL, 2000; EVANS & MAXWELL, 1990).

### **8.2.1 – Diluentes**

#### **Água de coco**

A água de coco é uma solução estéril que contém aminoácidos, açúcares, vitaminas, minerais e é pobre em fosfolípidios (NUNES, 2001; NUNES & SALGUEIRO, 1999; NUNES *et al.*, 1997).

A utilização da água de coco surgiu da necessidade do desenvolvimento de biotecnias que não permitissem a interação do plasma seminal com os componentes dos diluentes normalmente usados. O que pôde ser obtido com o uso de diluidores com pouca concentração de fosfolípidios, como é o caso da água de coco (TONIOLLI, 1989; NUNES, 1998).

A água de coco recomendada para utilização é proveniente do fruto como 6 meses de maturação. Nesta idade o coco apresenta osmolaridade em torno de 500 mOsm/L e pH de aproximadamente 4,5, que devem ser corrigidos com água bidestilada e citrato de sódio, para os valores encontrados no sêmen caprino que é de 300mOsm/L e 6,2 a 6,8, respectivamente (NUNES, 2001).

No intuito de identificar a fração que possui efeito benéfico sobre os espermatozoides, a água de coco foi ultra-filtrada através de uma coluna de Sephadex G25 e G50 para separação e identificação dos piques de acordo com a velocidade do produto pela coluna de gel (NUNES & SALGUEIRO, 1999). Foram recuperados 3 piques, sendo denominados A, B e C, sendo que o pique B apresentou um melhor desempenho tanto *in vitro* como *in vivo* para o sêmen caprino (NUNES & SALGUEIRO, 1999). Nunes & Combarous (1995) isolaram neste pique o ácido 3 indol-acético, sendo esta substância responsável pelo implemento do desempenho espermático, quando comparado com a água de coco total ou com os outros piques (NUNES & SALGUEIRO, 1999).

A água de coco vem sendo amplamente utilizada como diluente de sêmen de mamíferos (NUNES & COMBRANOUS, 1995; NUNES, 1998), dos quais podemos destacar resultados favoráveis na conservação *in vitro* de sêmen caprino (TONIOLLI, 1989) por até 72h (CAMPOS 2003; CAMPOS *et al.*, 2003b), bem como para as taxas de fertilidade e prolificidade (NUNES & SALGUEIRO, 1999).

### **8.2.1 – Crioprotetores**

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

A membrana plasmática dos espermatozoides é solúvel aos crioprotetores penetrantes, que entram nestas células, deslocando a água para fora da mesma, desidratando-a (AMANN, 1999; PURDY, 2005). Desta forma, no momento da congelamento, menos cristais de gelo serão formados no interior da célula, fornecendo

menos risco de morte celular. Este mesmo autor explica que o crioprotetor penetrante funciona como um solvente para sais e açúcares.

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

Os crioprotetores não-penetrantes e penetrantes têm efeito adicional, sendo que o primeiro fornece proteção aos espermatozóides até 0 °C enquanto o segundo age em temperaturas abaixo desta (SALAMON & MAXWELL, 1995).

### **Gema de ovo**

A gema de ovo, um componente comumente acrescentado aos diluentes, tem demonstrado efeitos benéficos no resfriamento do sêmen (GIL *et al.*, 2003), dentre os quais se destaca a proteção contra choques térmicos em temperaturas próximas de 0 °C, tanto durante a congelação, quanto durante a descongelação (SALAMON & MAXWELL, 1995; SALAMON & MAXWELL, 2000). A gema preserva a integridade das membranas acrossômica e mitocondrial, além de funcionar como um tampão osmótico (SALAMON & MAXWELL, 1995).

A lecitina, um componente encontrado na gema do ovo, reage com a fosfolipase A, uma proteína secretada pelas glândulas bulbouretrais do bode (NUNES, 1982) produzindo lisolecitinas, que são tóxicas para os espermatozóides (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

Contudo a gema de ovo é amplamente utilizada para criopreservação do sêmen desta espécie, sendo utilizada com bons resultados na concentração de 2 a 2,5% para sêmen resfriado (CAMPOS *et al.*, 2003b; CAMPOS, 2003; NUNES, 2001; ROCA *et al.*, 1997) e de 9 a 20% para congelação (CABRERA *et al.*, 2005; EIMAN & TERADA, 2004; GIL *et al.*, 2003; PÉREZ LLANO & MATEOS REX, 1995; CHAUHAN & ANAND, 1990).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUIAR, G.V.; CELES, C.K.S.; MONTEIRO, A.W.U.; CAMPOS, A.C.N.; AIRTON, A.A. Buck individual effect on the motility degradation rate of the semen cooled at 4 °C and stored for 48 hours. Abstracts. **Annals of International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, Nov. 15-18, 2006, Belo Horizonte, Brazil. P. 261, 2006a.

AGUIAR G.V.; ARAÚJO A.A.; MOURA A.A.A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1629-1638, 2006b.

AMANN, R.P., Cryopreservation of sperm. IN: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopedia of Reproduction**, Academic Press, Burlington, MA, p. 773–783, 1999.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 397-405, 1993.

AMIR, D.; GACITUA, H.; RON, M.; LEHRER, A.R.; Seasonal variation in semen characteristics and the fertility of Finn cross rams subjected to frequent ejaculation. **Animal Reproduction Science**, v. 10, p. 75-84, 1986.

ACHARYA, R.M.; GUPTA, U.D.; SEGHGAL, J.P.; SINGH, M. Coat characteristics of goats in relation to heat tolerance in the hot tropics. **Small Ruminant Research**, v.18, n.4, p.245-248, 1995.

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.

ARSLAN, M.; WEINBAUER, G.F.; SCHLATT, S. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primate (*Macaca mullata*). **Journal of Endocrinology**, v. 136, p. 235-243, 1993.

BAILEY, J.L.; ROBERTSON, L.; BUHR, M.M. Relationships among in vivo fertility computer – analyzed motility and in vitro  $Ca^{2+}$  flux in bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74 p. 53 –58, 1994.

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

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. As Glândulas Reprodutoras. IN: BERNE R.M.; LEVY, M.N. **Physiology** [traduzido para português]. Mosby, St Louis, Missouri, p. 910-955, 1998.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALVES, S.G.G.; BISCARDE, C.E.; VASCONCELOS, M.F.; OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n.1, p. 27-37, 2006.

BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. **Theriogenology**, v. 54, p. 899–905, 2000.

BYRNC, G.; LONCRGAN, P.; WADC, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.; BOLAND, M.; Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 265-275, 2000.

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

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; FIGUEIRÊDO, E.L.; ARAÚJO, A. A. Alterações adquiridas pelos espermatozóides durante o trânsito epididimário e a ejaculação. **Ciência Animal**, v. 10, n. 2, p. 77-86, 2000.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; SILVA FILHO, A.H.S.; MONTEIRO, A.W.U. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semi-árido Nordeste durante o período seco e chuvoso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 185-189, 2003a.

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

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

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

CBRA, **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed. Belo Horizonte/MG, p. 6-49, 1998.

CHACUR, M. Efeito nociceptivo induzido por fosfolipases A<sub>2</sub> (variantes lys49 e asp49) isoladas do veneno de serpentes *Bothrops asper*: caracterização dos mecanismos centrais e determinantes moleculares. **Tese** (Doutorado); Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 155p, 2004.

CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B.C.; PIERSON R.; BEARD A.P.; RAWLINGS N.C. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonographic in bull calve and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v. 48, p. 119-132, 1997.

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

CHEMINEAU, P., Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility, **Reproduction Nutrition Development**, v. 26, p. 453–460, 1986.

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

CHEMINEAU, P.; DELGADILLO J. A. Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. **Revevista Científica FCV-LUZ**, v. 3, p. 113-122, 1993.

CHEMIEAU, P.; BARIL, G.; LEBOEUF, B.; MAUREL, M.C.; COGNIE, Y. progrès récents en physiologie de la reproduction. **INRA Productions Animales**, v. 12, p. 135-146, 1999.

CHEMIEAU, P.; BARIL, G.; LEBOEUF, B.; MAUREL, M.C.; COGNIE, Y. Recent advances in the control of goat reproduction. IN: **Proc. VI Intl. Conf. on Goats**, May, 6-11, 1996, Beijing, China: 776-784, 1996.

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

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

CORTEEL, J.M. Production du sperme chez le bouc: variation saisonnière de la quantité et de la qualité du sperm récolte selon l'âge des animaux. **Journée Recherche Ovine et Caprine**, v. 1, p. 4-17, 1975.

CORTEEL, J.M. Production, storage and insemination of goat semen. **Symposium of management of reproduction in sheep and goats**, 1977, Madison - University of Wisconsin. Anais. p. 41 – 57. 1977.

COUROT, M.; ORTAVANT, R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement. v. 30, p.47-60, 1981.

CUNNINGHAM, J.G. Ciclos Reprodutivos. IN: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 312-318, 1993.

DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 87-94, 1992.

DELGADILLO, J. A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. **Reproduction Nutrition Development**, v. 33, p. 609-617, 1993.

DELGADILLO, J.A.; MALPAUX, B. CHEMINEAU, P. La reproduction des caprins dans les zones tropicales et subtropicales. **INRA Productions Animales**, v. 10 (1), 33-41, 1997

DELGADILLO, J.A.; CANEDO, G.A.; CHEMINEAU, P.; GUILLAUME, D.; MALPAUX, B. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. **Theriogenology**, v. 52, p. 727-737, 1999.

DELGADILLO, J.A.; CARRILLO, E.; MORÁN, J.; DUARTE, G.; CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B. Induction of sexual activity of male Creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. **Journal Animal Science**, v. 79, p. 2245–2252. 2001.

DELLMANN, H.D.; WROBEL, K.H. Sistema Reprodutor Masculino. IN DELMANN, H.D.; BROWN, E.M. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p.233–238. 1982.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P., Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10149–10155. 1992.

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.

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

ELOY, A.M.X.; SANTA ROSA, J. Perfis plasmáticos de testosterona durante a puberdade de machos caprinos da raça Moxotó. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, nº. 10, p. 1645-1652, 1998.

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

EVANS A.C.O.; PIERSON, R.A.; GARCIA, A. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 46, p.345-357, 1996.

FABRE-NYS, C. Le comportement sexuel des caprins: contrôle hormonal et facteurs sociaux. **INRA Productions Animales**, v. 13, p. 11-23, 2000.

FAN, J.; LEFEBVRE, J.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. **Gene**, v. 21, p. 63-74, 2006.

FERNANDES, A.W. Morfologia comparada das glândulas anexas do macho caprino do tipo SRD nas estações seca e chuvosa no Estado do Ceará. Fortaleza: UECE, Faculdade de Veterinária, 1994. 34p. **Dissertação** (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1994.

FERRARI, S.; LEINZ, F.; BARNABE, V. H. Inseminação artificial em cabras com sêmen congelado: resultados preliminares. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v. 35, n. 5, p. 223-224, 1998.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóide e Plasma Seminal (capítulo 7). In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ª ed. São Paulo: Editora Manole, 582 p. 2004.

GIER, H.T.; MARION, G. B. Development of the mammalian testis IN: JOHNSON, A. D.; GOMES W. R.; VANDEMARK, N. L. **The testis**. New York and London: Academic Press. v. 1. p. 2-45, 1970.

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

GIRÃO, R.N.; MIES FILHO, A. Teores de frutose e de ácido cítrico no sêmen de carneiros da raça Corriedale, submetidos a fotoperíodo e temperaturas naturais e artificiais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n. 3, p. 137-142. 1989.

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

GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Laboratório de Bioquímica Clínica Animal. Porto Alegre, 2002.

GRIFFIN, J.E. Male reproductive function. IN: GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R (Eds.). **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, p.165-185, 1988.

GRISWOLD, M.D. Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. IN: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. **The Sertoli Cell**. Clearwater, FL: Cache River Press. 494–508, 1993.

GUYTON, A. C. Sistemas reprodutivos masculino e feminino e seus hormônios. IN: GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana**. 6º ed. p. 498–504. Rio de Janeiro: Editora Guanabara. 1998.

HAFEZ, E.S.E. Anatomia da reprodução masculina. IN: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Editora Manole Ltda, Barueri – SP, p. 3-12, 2004.

HAFEZ, E.S.E.; JAINUDEEN, M.R.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. IN: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Editora Manole Ltda, Barueri – SP, p. 33-53, 2004.

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

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

IKEDA, M.; RAHMAN, M.D.H; MORITANI, C.; UMAMI, K.; TANIMURA, Y.; AKAGI, R.; TANAKA, Y.; MAESHIMA, M.; WATANABE, Y. A vacuolar H<sup>+</sup> - pyrophosphatase in *Acetabularia acetabulum*: molecular cloning and comparison with higher plants and a bacterium. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p.139-140, 1999.

JINDAL, S.K.; PANDA, J. N. Maturation changes of goat spermatozoa during transit through the epididymis. **Andrology**, v. 12, n. 4, p. 328-331, 1980.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G.; Characteristics and seasonal variations in the semen of alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. **Theriogenology**, v. 53, p. 1285-1293, 2000.

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

KIERSZENBAUM, A. A maturação e transporte dos espermatozoides. IN: KIERSZENBAUM, A. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Editora Elsevier, Rio de Janeiro – RJ, p. 583-597, 2004.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; CANCEL, A.M.; GERENA, R.L.; RODRIGUEZ, C.M.; DAY, J.R. Male factors affecting sperm fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.2, p. 83-85, 1999.

LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRÍGUEZ, J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1035 – 1048, 2002.

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

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

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

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of reproductive immunology**, v. 53, P. 109-119, 2002.

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

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. **Biochemical Journal**, v. 40, n. 4, p. 481-491. 1946.

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

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

MARKUS, R.P.; AFECHÉ, S.C.; BARBOSA Jr., E.M.; LOTUFO, C.M.C.; FERREIRA, Z.S.; CIPOLLA-NETO, J. Disponível em: **Glândula Pineal e Melatonina**, 2002. <<http://www.crono.icb.usp.br/glandpineal.htm>>. Acesso em: 31/01/2008.

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

McCRABB, G.J, BORTOLUSSI, G. HENNOSTE L.M.; MCDONALD, B.J. The thermal response of sheep to a hot environment in different years. **Journal of Agricultural Science**, v. 125, p. 153–158. 1995.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5ª ed. Porto Alegre, Sulina, 783p., 1982.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. Porto Alegre, Sulina. 6ª ed. v. 1, 314p., 1987.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2007.

MOURA, A.A.; ERICKSON, B.H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testis size and number of Sertoli and germ cell in yearling beef bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, p. 183-190, 1997.

NUNES J.F. Inseminação artificial em caprinos. IN: GOLSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela. p. 111-126, 2001.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 2 p. 109-112, 1998.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, p. 17-26, 1999.

NUNES, J.F.; CIRÍACO, A.T.L.; SUASSUNA, U. **Produção e Reprodução de Caprinos e Ovinos**. Fortaleza: Editora Gráfica LCR, 2ª ed, p. 47 – 48, 1997.

NUNES, J.F.; RIERA, G.S. SILVA, A.E.F.D.; LEON B, F.A.P.; LIMA, F.A.M. **Características espermáticas de caprinos da raça Moxotó de acordo com a morfologia escrotal**. Circular técnica 6, Sobral/CE: EMBRAPA/CNPC, 1983.

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

NUNES, J.F., COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, v. 5, n.1-2, p.15-21, 1995.

NUÑEZ, Q. M. Morfologia del tract genital de los pequeños rumiantes. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 3, n. 2, p. 77-86, 1993.

OGEBE, P.O.; OGUNMODEDE, B.K.; McDOWELL, L.R. Behavioral and physiological responses of Nigerian dwarf goats to seasonal changes of the humid tropics. **Small Ruminant Research**, v. 22, p. 213-217, 1996.

PARVINEN, M. Cyclic function of Sertoli cells. IN: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. **The Sertoli Cell**. Clearwater, FL: Cache River Press. p. 332–347, 1993

PAW, I.M.C.; SOOM, A.V.; MAES, D.; VERBERCKMOES, S.; KRUIF, A. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, p. 1109-1122, 2003.

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**, v. 27, n.5, p. 1023-1031, 1997.

PEREZ LLANO, B.; MATEOS REX, E. Efecto del tipo de crioprotector externo e del porcentaje de glicerol sobre la calidad in vitro del semen congelado de macho cabrio. **Producción y Sanidad Animal**, v. 10, n° 3, p. 211-221, 1995.

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. 1996a.

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Níveis de Cálcio, Fósforo, Magnésio e pH do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 33, Fortaleza, Anais. Fortaleza, p. 419-421, 1996b.

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

RIVER, C.; RIVERST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 523-532, 1991.

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

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

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

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

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.

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

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R. A. HIKIM A. P. S., CLEGG, E.D. **Histological and Histopathological. Evaluation of the Testis**, Carbondale: Cache River Press, 1990.

RUSSEL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue & Cell**, v. 27, n.2, p.129-146, 1995.

SALAMON, S., MAXWELL W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

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

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para a avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 1934-1942, 2006.

SENGER, C.C.D. **Papel dos minerais como co-fatores enzimáticos**, 2002. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/minerais.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2008.

SHAMSUDDIN, M.; AMIRI, Y.; BHUIYAM, M. M. U. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 53-57, 2000.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**, 2<sup>a</sup> ed. New York: Raven Press, v. 1, p. 1364-1434, 1994.

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

SINGH, M. P.; SINHA, A. K.; SINGH, B. K.; Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 1047-1053, 1995.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Processos Reprodutivos da Fêmea. In: SWENSON, M. J.; REECE, W., Dukes **Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 615-644. 1996.

STORNELLI, M. C.; TITTARELLI, C. M.; SAVIGNONE, C. A.; STORNELLI, M. A. Efecto de os procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v. 25 (2), p. 28-35, 2005.

TONIOLLI, R. Estudo das características "in vitro" do sêmen caprino de raças nativas do Nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma "in natura", estabilizada e de gel. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, p. 209-220, 1989.

TRUMMER, H.; TUCKER, K.; YOUNG, C.; KAULA, N.; MEACHAM, R.; B. Effect of storage temperature on perm cryopreservation. **Fertility and sterility**, v. 70 n. 6, 1998.

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

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALMEIDA, A.K, PORTELA, A.P.M.; BITTENCOURT, R.F. ALVES, S.G.G.; BITTENCOURT, T.C. C.; QUINTELA, A.T. 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**, v. 7, n. 1, p. 67-76, 2006.

VILLAR FILHO, A.C.; BIRGEL, E.H.; BARNABÉ, V.H.; VISINTIN, J.A.; BARNABÉ, R.C. Características testiculares e seminais de caprinos na região semi-árida do estado da Paraíba. II. Características seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 17, n.1/2, p.23-32, 1993.

VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H.; DeJARNETTE, J.M.; McGILLIARD, M.L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p.3827-3835, 1991.

WATSON, P.; F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

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

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

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

ZAMIRI, M.J.; HEIDARI, A.H. Reproductive characteristics of Rayini male goats of Kerman province in Iran. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 176-185, 2006.

## **CAPÍTULO 2**

**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 estado do Ceará**

**(Individual and season effect on seminal plasma composition and goat semen quality stored at 4 °C for 48 hours on Ceará State)**

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da época do ano (chuvosa ou seca) sobre a composição do plasma seminal e parâmetros seminais de 17 caprinos sem padrão racial definido, criados em região quente e úmida e avaliar se a composição bioquímica do plasma seminal destes animais apresenta correlação com os parâmetros qualitativos do sêmen, em função da época do ano. Durante as épocas chuvosa (março a maio) e seca (setembro a novembro), os ejaculados dos animais foram coletados semanalmente para avaliação bioquímica do plasma seminal e a cada 15 dias para determinação dos parâmetros seminais. O sêmen fresco foi avaliado quanto à motilidade massal, volume e concentração espermática, em seguida foi diluído em água de coco acrescido de 2,5% gema de ovo ( $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL) e avaliados quanto ao vigor e motilidade. O sêmen diluído foi resfriado a 4 °C, conservado por 48 horas e avaliado para vigor e motilidade às 2, 24 e 48 horas (T2, T24 e T48) de conservação, pelo teste de termorresistência lento (TTR). Esfregaços do sêmen diluído foram confeccionados e corados com azul de bromofenol durante o TTR, 200 células foram avaliadas classificadas como morfologicamente normais ou anormais. Determinou-se as concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, Ca, P e Mg e a atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal. O volume, a concentração, o vigor e a motilidade espermática não apresentaram diferenças entre as duas épocas do ano, enquanto motilidade massal foi maior na época chuvosa. A qualidade espermática diminuiu à medida que se prolongou o tempo de conservação. O sêmen apresentou qualidade superior na época chuvosa e as concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, P e Mg foram maiores nesta época. A fosfolipase A<sub>2</sub> apresentou menor atividade na época chuvosa. Obteve-se correlação baixa e positiva entre a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> e o percentual de espermatozoides com morfologia normal durante a época chuvosa e negativa e de baixa a moderada com os outros componentes bioquímicos estudados. A concentração de frutose, ácido cítrico e proteínas totais mostraram correlações positivas com o vigor e a motilidade e negativas com a TDM. Em relação à morfologia espermática, a concentração de frutose mostrou correlações positivas, enquanto as de ácido cítrico e proteínas totais, negativas. Os níveis de fósforo no plasma seminal apresentaram correlação com os parâmetros seminais apenas na época seca, sendo negativa para vigor e motilidade e positiva para TDM e percentagem de espermatozoides com morfologia

normal. A concentração de Mg correlacionou-se positivamente com a motilidade na época chuvosa e negativa com a normalidade da morfologia espermática na época seca. Os resultados do presente estudo indicam que caprinos criados em clima tropical apresentam melhor qualidade espermática no período chuvoso, além das concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, P e Mg serem mais elevados nesta época. Sugere-se, portanto, que estes animais devem apresentar melhor desempenho reprodutivo na época chuvosa. O fato de haver correlações entre os parâmetros seminais e a composição bioquímica do plasma seminal pode indicar que as diferenças detectadas quanto à qualidade espermática entre as épocas do ano deve-se justamente às variações na concentração destes mesmos componentes.

## ABSTRACT

This study aimed to verify the effect of the season of the year (rainy or dry season) on the seminal plasma composition of the seventeen bredcross male goats raised in tropical region and to evaluate if the biochemical composition of the seminal plasma was correlated to semen qualitative parameters in relation to the season of the year. On March to May (rainy season) and September to November (dry season), the ejaculates were collected in artificial vagina, once a week, the SP was separated to evaluate the biochemical parameters and biweekly for quality semen determination. The semen was evaluated to massal motility, volume and spermatic concentration, following, the sperm was diluted in coconut water added 2,5% of egg yolk ( $200 \times 10^6$  spermatozoa/mL) and stored at 4 °C for 48 hours. The vigor (0-5) and motility (1-100%) were measured at 2, 24 and 48 hours after cooling by slowly thermoresistance test (TRT). The motility degradation rate (MDR) was calculated after TRT. Slides of sperm were made during TRT and 200 cells were classified as normal or abnormal morphology. The fructose, citric acid, total proteins, calcium, phosphorus and magnesium level in the SP were measured. The volume and spermatic concentration did not show difference between seasons of the year, while the massal motility was higher in rainy season. The seminal quality decreased with time ( $p < 0,001$ ). The semen obtained in the rainy season was better quality than semen collected in the dry season of the year. In addition, the fructose, citric acid, total proteins, phosphorus and magnesium levels in the SP were higher in rainy season, while the PLA<sub>2</sub> activity was lower in this period ( $p < 0,05$ ). The PLA<sub>2</sub> activity showed a low and positive correlation with normal morphology of the spermatozoa in rainy season and a moderate and negative with the biochemical parameters. The fructose, citric acid and total proteins concentration showed positive correlations to vigor and motility and negative correlation with the MDR, in both seasons. The total sperm morphology alterations (TSMA) showed negative correlation with fructose level and positive correlations with citric acid, total proteins concentrations and PLA<sub>2</sub> activity level. The phosphorus concentration in the seminal plasma showed correlation with seminal parameters only in dry season: negative to vigor, motility and TSMA and positive to MDR. The magnesium level showed positive correlation with sperm motility, at rainy season and TSMA, at dry season. These results indicated that male goats raised in tropical region showed better seminal quality in the

rainy season. In addition, the fructose, citric acid, total proteins, phosphorus and magnesium concentration levels in the SP were higher in rainy season, while the PLA<sub>2</sub> activity was lower in this period. The correlations between the seminal and biochemical parameters in SP could indicate that the differences in the semen parameters in the rainy and dry season occurred due the biochemical parameter variations.

## INTRODUÇÃO

Na última década, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para o aprimoramento de biotecnologias associadas à reprodução animal com o objetivo geral de garantir o beneficiamento e conservação do sêmen para fins de inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro* (NUNES, 1998; TRUMMER *et al.*, 1998; HOLT, 2000; YOSHIDA, 2000; PAUW *et al.*, 2003; STORNELLI *et al.*, 2005; BITTENCOURT *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2006). Neste sentido, há abordagens específicas também para a definição do melhor método, intervalo e época do ano (AMIR *et al.*, 1986; LIMA *et al.*, 1994; RODRIGUES, 1997; SHAMSUDDIN *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2006) para a colheita e preservação de amostras de sêmen, bem como estratégias apropriadas para diluição (WATSON, 2000) e uso de diluidores mais eficazes (SINGH *et al.*, 1995; NUNES, 1998; GIL *et al.*, 2003; EIMAN & TERADA, 2004; PURBY, 2005).

A estimativa das taxas de não-retorno ao estro associadas a cada reprodutor é um dos principais indicadores do seu desempenho reprodutivo, mas esta informação torna-se disponível somente quando o animal já se encontra em fase de produção comercial de sêmen. Portanto, a expectativa de se dispor de marcadores ou parâmetros que possam indicar o potencial reprodutivo do animal *in vivo* tem sido objeto de vários estudos. Apesar da avaliação de parâmetros seminais tais como a motilidade e percentagem de defeitos espermáticos fornecerem um razoável indicativo do potencial reprodutivo de um animal ou pelo menos de uma determinada amostra de sêmen, estes critérios são de utilidade limitada para a predição da fertilidade. Mesmo a utilização de outras ferramentas, como a análise computadorizada do sêmen e ensaios de integridade acrossômica (KJAESTAD *et al.*, 1993; JANKAUSKAS *et al.*, 2000) fornecem informações limitadas como indicadores da fertilidade potencial. Isto ocorre porque o processo de fertilização constitui-se de uma série complexa de eventos e alguns destes métodos certamente não levam em consideração muitas das variáveis que de fato influenciam a ligação do espermatozóide ao óvulo e a fertilização propriamente. Neste sentido, análises bioquímicas, associadas aos critérios já existentes de avaliação da qualidade espermática, poderiam certamente auxiliar na identificação de diferenças importantes entre os índices de fertilidade dos animais. Aliado à avaliação física e morfológica do ejaculado, o conhecimento da composição bioquímica do plasma

seminal pode indicar variações na atividade do epidídimo ou das glândulas sexuais anexas e no metabolismo dos espermatozoides (KILLIAN *et al.*, 1999; FAN *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2007).

Estudos preliminares demonstraram haver efeito individual do reprodutor sobre a taxa de degradação da motilidade (AGUIAR *et al.*, 2006) e sobre a composição bioquímica do plasma seminal, tanto para os componentes minerais (cálcio, fósforo e magnésio) como orgânicos (frutose, ácido cítrico e proteínas totais) (CATUNDA, 2007), resultados que sugerem a existência de relações entre estes componentes seminais e aspectos da função espermática. Outro fator a ser considerado é a influência das variações ambientais ao longo do ano de forma que, em regiões próximas à linha do Equador, fatores climáticos como temperatura, umidade relativa do ar, precipitação e irradiação solar provocam alterações nas atividades fisiológicas em caprinos (OGEBE *et al.*, 1996). O estresse térmico, além de interferir nos parâmetros fisiológicos e ingestão de alimentos (OGEBE *et al.*, 1996), altera também o desempenho reprodutivo dos animais, interferindo na atividade do eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal (RIVER & RIVEST, 1991).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da época do ano sobre a composição do plasma seminal (cálcio, fósforo, magnésio, frutose, ácido cítrico e proteínas totais, atividade da FLA<sub>2</sub>) e sobre os parâmetros seminais (vigor, motilidade, taxa de degradação da motilidade e morfologia espermáticas) de caprinos sem padrão racial definido, criados na região litorânea do estado do Ceará, com clima quente e úmido. Também se delineou a hipótese de que a composição bioquímica do plasma seminal destes animais apresenta correlação significativa com os parâmetros do sêmen, em função da época do ano.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Local do experimento e condições ambientais

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, localizado à latitude sul de 3°45', longitude oeste de 38°32' e altura de 15,5 m acima do nível do mar. O clima da região, de acordo com a classificação de Koppen, é AW, com clima quente e úmido, com médias térmicas entre 26 a 27 °C, máximas de 30 °C e mínimas de 19 °C. O experimento foi conduzido durante o ano de 2006, considerando-se como chuvosa a época entre os meses de março a maio, caracterizada por uma precipitação média de  $345,0 \pm 123,4$  mm, umidade relativa de  $82,3 \pm 3,2$  % e temperatura média de  $27,0 \pm 3,2$  °C, com intervalo de  $24,4 \pm 0,4$  a  $30,3 \pm 0,4$ . A época seca do mesmo ano compreendeu os meses de setembro a novembro, com precipitação média de  $5,4 \pm 4,3$  mm, umidade relativa de  $69,0 \pm 1,0$  % e temperatura média de  $27,6 \pm 0,1$  °C, associada à amplitude de  $25,2 \pm 0,3$  a  $31,1 \pm 0,2$ . O Índice de Temperatura e Umidade (ITU) calculado foi de  $75,10 \pm 1,17$  no período chuvoso, com amplitude de 73,64 a 76,77 e de  $75,44 \pm 1,53$  no período seco, com mínimo de 73,31 e máximo de 77,53. De acordo com estabelecido por Pereira (2005), os animais estavam em estado de alerta de conforto térmico durante o experimento.

### 2.2 - Animais experimentais

Foram utilizados 17 caprinos sem padrão racial definido (SPRD), com idade média de  $26,2 \pm 5,4$  meses e peso médio de  $41,1 \pm 4,2$  Kg. Durante o experimento, os animais foram criados em baias individuais, alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylum*) e concentrado adicionado de sal mineral, dividido em duas ofertas diárias de 250g cada (NRC, 1981). Água foi fornecida à vontade.

### 2.3 - Coleta do sêmen

Os ejaculados dos animais foram coletados semanalmente para a separação do plasma seminal, durante os três meses de cada época (seca e chuvosa). O sêmen de cada

animal foi centrifugado a 4 °C e 4000 g por 20 minutos e em seguida, separado o plasma seminal para refrigeração a -18 °C até o momento das análises bioquímicas. Devido ao pequeno volume de plasma seminal coletado, foi necessário fazer um pool mensal das coletas por animal, resultando em uma amostra por animal por mês.

Uma segunda coleta de sêmen, destinada à análise dos parâmetros seminais, foi realizada a cada duas semanas, sempre dois dias após as coletas para obtenção do plasma seminal. Ao todo, obtiveram-se seis coletas por animal por época, totalizando 204 ejaculados. O sêmen dos caprinos foi coletado através de vagina artificial e com o auxílio de uma cabra para monta dos animais. Antes da coleta, os animais tiveram o prepúcio lavado com água e detergente neutro e enxuto com toalha de papel para evitar contaminação do sêmen.

#### **2.4 - Análise do sêmen**

Avaliou-se o volume do ejaculado no momento da coleta e a motilidade massal do sêmen fresco através da metodologia descrita por Chemineau *et al.* (1991), na qual se utiliza uma escala de 0 a 5. Uma amostra de 50µl do sêmen foi diluída em solução salina formolizada (0,1%) e analisada no espectrofotômetro para determinação da transmitância e posterior cálculo da concentração espermática (CHEMINEAU *et al.*, 1991). O sêmen foi previamente diluído na proporção de 1:1 em diluidor à base de água de coco *in natura*, a 32 °C e, após a determinação da concentração espermática, foi realizada a diluição final (com mesmo diluidor), ainda a 32 °C, para obter uma concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozóides/ml. Nesta concentração, foi então avaliado a motilidade espermática, definida com a percentagem de espermatozóides móveis (CBRA, 1998) e o vigor (escala de 0 a 5) dos espermatozóides (CHEMINEAU *et al.*, 1991).

O diluidor à base de água de coco foi preparado com 50% de água de coco *in natura* e 50 % de citrato a 2,5 %, com objetivo de manter a solução em pH entre 6,2 e 6,8 e osmolaridade de 300 mOsm. Desta solução estoque, retirou-se 2,5 % do volume para o acréscimo de igual volume de gema de ovo (NUNES, 1998).

## 2.5 - Teste de termorresistência (TTR)

Depois da diluição final, o sêmen foi resfriado, por cerca de duas horas, até atingir a temperatura de 4 °C, conservado por 48 horas e avaliado para os parâmetros de vigor e motilidade a cada 24 horas a partir de 2 horas, sendo determinados os seguintes tempos de avaliação: T2, T24 e T48. Para proceder com o teste de termorresistência, uma amostra de 250 µl de sêmen foi levada ao banho-maria a 38 °C, para reanimação dos espermatozóides. Uma gota do sêmen foi então posta sobre lâmina e coberta com lamínula, e levada ao microscópio ótico para avaliação dos parâmetros seminais aos 5, 60 e 120 minutos de incubação. A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final do teste de termorresistência, utilizando a seguinte fórmula:

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

## 2.6 - Morfologia espermática

Esfregaços do sêmen diluído foram confeccionados aos 5 e 120 minutos após o início do teste de termorresistência, para cada tempo (T2, T24 e T48), perfazendo um total de 06 esfregaços por animal por coleta. Os esfregaços foram corados com azul de bromofenol e, em seguida, 200 células foram avaliadas em microscopia ótica, em aumento de 1000x, e classificadas morfológicamente como normais ou anormais (defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal e defeitos de flagelo) (COLAS, 1980).

## 2.7 - Avaliação Bioquímica do Sêmen

A atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> foi mensurada através de adaptações da metodologia de Haas *et al.* (1968). Como substrato, preparou-se uma solução de uma gema de ovo com 50 mL de água destilada e a uma amostra de 15 mL desta solução foi adicionado 10 mL de deoxicolato de sódio a 0,03 M e 1 mL de CaCl<sub>2</sub> a 0,6 M. Água destilada foi em seguida adicionada até completar 100 mL, de forma que a concentração

final do deoxicolato de sódio e o  $\text{CaCl}_2$  foram de  $3 \times 10^{-3}$  e  $6 \times 10^{-3}$ , respectivamente. O pH desta solução foi corrigido para 7,8 a 8,0 utilizando-se NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 10 mL desta solução foi retirada e levada ao pHmêtro e adicionada de 20  $\mu\text{L}$  de plasma seminal caprino. Uma alíquota 3  $\mu\text{L}$  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 3 minutos.

No final do ensaio, foi calculada a média das diferenças dos tempos anotados e multiplicada por um fator de correção com a finalidade de determinar a unidade de consumo de NaOH/minuto/20  $\mu\text{L}$  de plasma seminal caprino adicionado à solução de uso. A determinação da atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal foi realizada em triplicata e a média dos três resultados foi utilizada para as análises estatísticas.

## **2.8 - Análise estatística**

Os parâmetros seminais e bioquímicos do sêmen foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para determinar os efeitos de tempo de conservação, animal (efeito individual), época do ano e a existência de interação entre os efeitos indivíduo e época (SAS, versão 8.0, 2000). As variáveis motilidade e TDM sofreram transformação angular para atender à condição de normalidade. Um estudo de correlação simples de Pearson foi realizado para testar o grau de associação entre as variáveis bioquímicas (frutose, ácido cítrico, proteínas totais, cálcio, fósforo, magnésio e atividade da FLA<sub>2</sub>) e os parâmetros seminais avaliados nas épocas chuvosa e seca.

## RESULTADOS

### 3.1 - Parâmetros Seminais

As variáveis volume ( $0,9 \pm 0,3$  mL) e concentração espermática ( $2,5 \pm 0,2$  bilhões de espermatozoides/ml) não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) entre as épocas do ano estudadas. Observou-se que a motilidade massal dos espermatozoides na época chuvosa ( $4,3 \pm 0,4$ ) foi mais elevada do que na época seca ( $4,0 \pm 0,7$ ;  $p < 0,0001$ ) porém, o vigor ( $3,4 \pm 0,4$  e  $3,4 \pm 0,4$ ) e a motilidade ( $75,7 \pm 8,4$  e  $77,9 \pm 7,6$ ) do sêmen fresco diluído em água de coco não apresentaram alterações nos respectivos períodos ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao sêmen resfriado, verificou-se que o tempo de conservação do sêmen resfriado a  $4^\circ\text{C}$  teve influência sobre o vigor e a motilidade espermática, tanto na época chuvosa quanto seca ( $p < 0,0001$ ), de forma que estes parâmetros diminuíram com o tempo de armazenamento. Não foi observado efeito do tempo de conservação do sêmen sobre a TDM durante a época chuvosa, porém, na época seca do ano, a TDM avaliada 2 horas após o início do resfriamento foi maior do que aquela encontrada às 48 horas ( $p < 0,05$ ; Tabela 1). O vigor e a motilidade espermática foram mais elevados no período chuvoso em todos os tempos de conservação do sêmen resfriado, enquanto a TDM foi maior na época seca do que na chuvosa, apenas em T2 ( $p < 0,0001$ ; Tabela 1).

O efeito individual também teve grande influência ( $p < 0,0001$ ) sobre todos os parâmetros seminais avaliados (Figura 1) nas épocas avaliadas neste estudo. Foi descrito a existência de interação significativa entre os efeitos individual e de época do ano para as variáveis: vigor ( $p < 0,05$ ), motilidade e TDM ( $p < 0,0001$ ; Figura 2).

Não foi observado efeito de tempo de resfriamento do sêmen sobre a morfologia espermática (Tabela 2). Contudo, os efeitos individual e de época foram altamente significativos ( $p < 0,0001$ ) sobre este parâmetro. Sendo que os espermatozoides apresentaram maior proporção de normalidade na época chuvosa. Houve ainda uma interação entre animal e época sobre a normalidade da morfologia espermática ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** – Efeito do tempo de conservação e da época do ano sobre o sêmen caprino, diluído em água de coco com 2,5 % de gema e resfriado a 4 °C durante 48 horas, o vigor, a motilidade e a taxa de degradação da motilidade (TDM).

Tempo (Horas)	Vigor <sup>1</sup>		Motilidade <sup>1</sup>		TDM <sup>2</sup>	
	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca
2	2,6 ± 0,5 <sup>aA</sup>	2,1 ± 0,8 <sup>aB</sup>	58,2 ± 10,5 <sup>aA</sup>	51,0 ± 16,8 <sup>aB</sup>	28,2 ± 24,8 <sup>aB</sup>	57,6 ± 36,4 <sup>aA</sup>
24	2,3 ± 0,6 <sup>bA</sup>	1,6 ± 1,1 <sup>bB</sup>	51,7 ± 13,9 <sup>bA</sup>	40,1 ± 25,7 <sup>bB</sup>	28,2 ± 29,0 <sup>aB</sup>	50,5 ± 36,4 <sup>abB</sup>
48	2,1 ± 0,7 <sup>cA</sup>	1,3 ± 1,1 <sup>cB</sup>	44,2 ± 16,2 <sup>cA</sup>	30,7 ± 27,1 <sup>cB</sup>	27,1 ± 29,4 <sup>aB</sup>	43,5 ± 35,9 <sup>bB</sup>

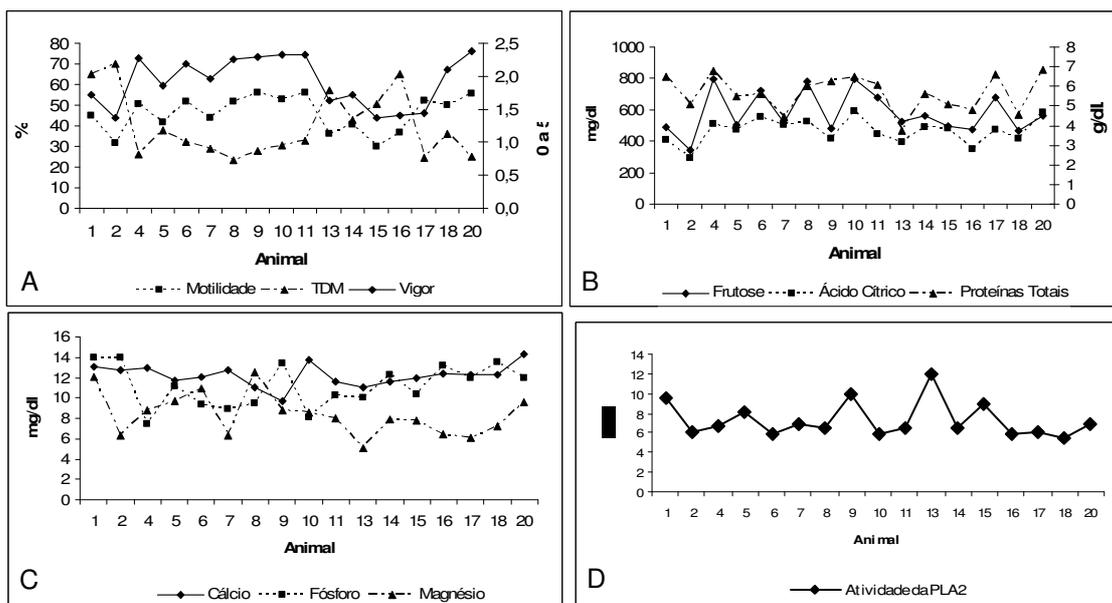
Letras maiúsculas – comparação entre épocas, na mesma linha;

Letras minúsculas – comparação entre tempos, na mesma coluna; <sup>1</sup>p < 0,0001; <sup>2</sup>p < 0,05.

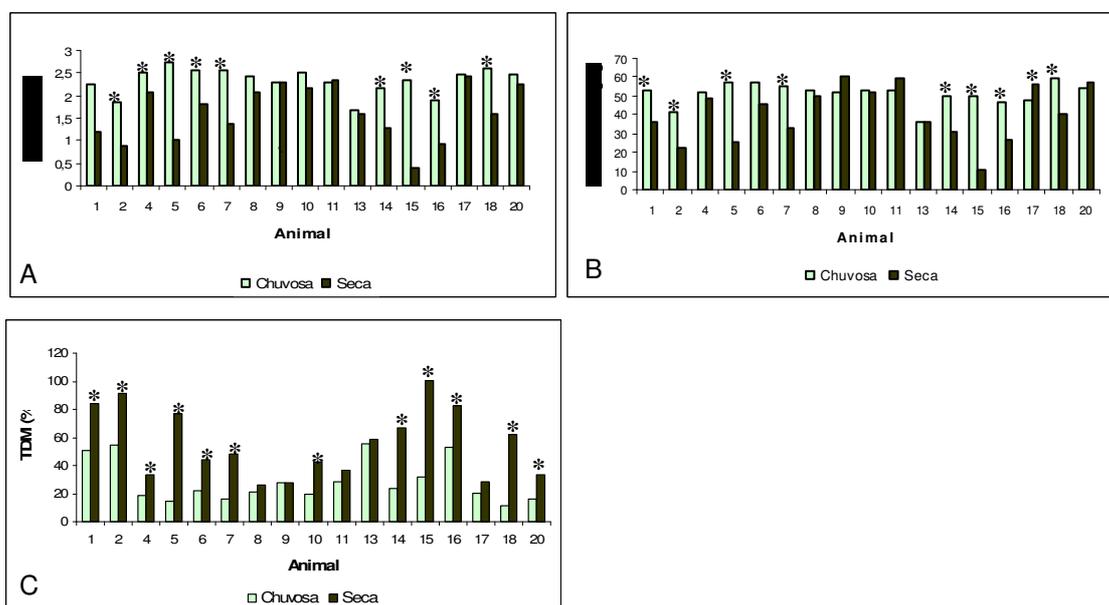
**Tabela 2** - Efeito do tempo de conservação e da época do ano sobre a morfologia espermática do sêmen caprino diluído e resfriado a 4 °C e estocado por 48 horas.

Tempo (Horas)	Normal		Alterada	
	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca
2	84,9 + 8,3 <sup>A</sup>	80,8 + 7,6 <sup>B</sup>	15,15 + 8,3 <sup>B</sup>	19,2 + 7,6 <sup>A</sup>
24	85,9 + 8,1 <sup>A</sup>	81,8 + 8,1 <sup>B</sup>	14,1 + 8,1 <sup>B</sup>	18,2 + 8,1 <sup>A</sup>
48	86,0 + 6,6 <sup>A</sup>	81,9 + 6,9 <sup>B</sup>	14,0 + 6,6 <sup>B</sup>	18,1 + 6,9 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas – comparação entre épocas, dentro da mesma linha; (p < 0,05).



**Figura 1** – Variabilidade individual referente aos parâmetros de: (A) vigor (escala de 0 a 5), motilidade e TDM (0 a 100%) do sêmen caprino resfriado a 4 °C por 48 horas; (B) concentrações de frutose (mg/dL), ácido cítrico (mg/dL) e proteínas totais (g/dL); (C) Ca, P e Mg (mg/dL) e atividade da FLA<sub>2</sub> (U/mL, onde U = μmol de ácido graxo liberado por minuto).



**Figura 2** – Interação dos efeitos indivíduo e época do ano sobre o vigor (A), motilidade (B) e TDM (C) no sêmen caprino diluído e resfriado a 4 °C durante 48 horas. \*p < 0,05.

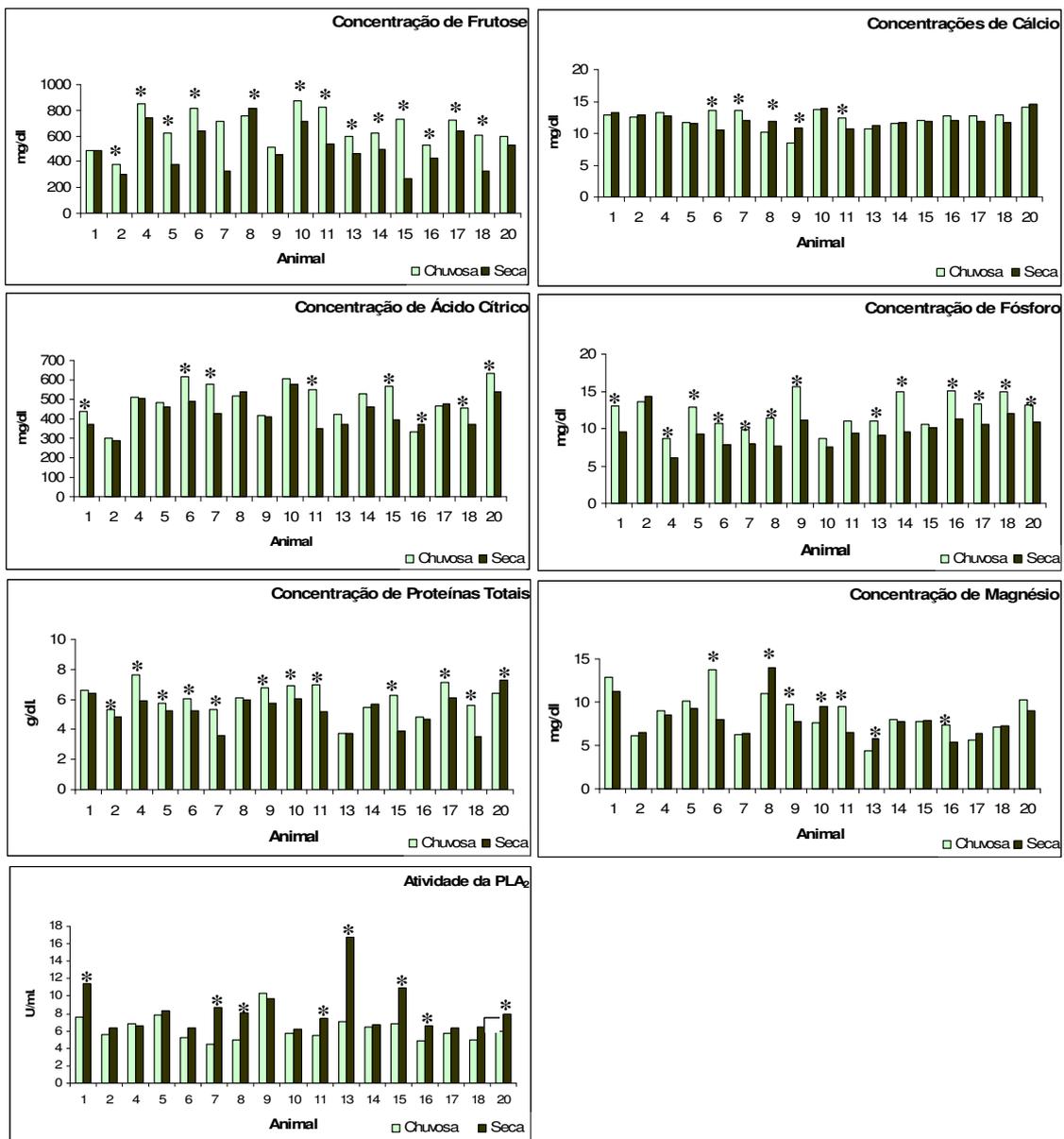
### 3.2 - Parâmetros bioquímicos do plasma seminal

As concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, fósforo e magnésio no plasma seminal dos caprinos SPRD foram maiores na época chuvosa quando comparadas às da época seca do ano ( $p < 0,05$ ), enquanto que a fosfolipase A<sub>2</sub> apresentou menor atividade na época chuvosa ( $p < 0,05$ ; Tabela 3). Demonstrou-se também a existência de interação significativa entre animal e época do ano, para todos os componentes bioquímicos avaliados ( $p < 0,0001$ ; Figura 3).

**Tabela 3** – Efeito da época do ano (chuvosa ou seca) sobre a concentração de componentes bioquímicos do plasma seminal caprino.

Época	Cálcio (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)	Magnésio (mg/dL)	Proteínas Totais (g/dL)	Ácido Cítrico (mg/dL)	Frutose (mg/dL)	Atividade da FLA <sub>2</sub> (U/mL)
Chuvosa	12,3 ± 2,1 <sup>A</sup>	12,3 ± 2,6 <sup>A</sup>	8,6 ± 3,9 <sup>A</sup>	6,1 ± 1,2 <sup>A</sup>	495,4 ± 119,8 <sup>A</sup>	660,1 ± 157,4 <sup>A</sup>	6,2 ± 1,9 <sup>B</sup>
Seca	12,1 ± 2,4 <sup>A</sup>	9,7 ± 3,7 <sup>B</sup>	8,1 ± 3,7 <sup>B</sup>	5,2 ± 1,4 <sup>B</sup>	435,6 ± 108,2 <sup>B</sup>	502,6 ± 203,8 <sup>B</sup>	8,1 ± 3,3 <sup>A</sup>

Letras minúsculas – comparação entre épocas, na mesma coluna;  $p < 0,05$ .



**Figura 3** – Interação dos efeitos indivíduo e época sobre os parâmetros bioquímicos seminais. Concentrações de: frutose (mg/dL), ácido cítrico (mg/dL), proteínas totais (g/dL), cálcio (mg/dL), fósforo (mg/dL), magnésio (mg/dL) e atividade da FLA<sub>2</sub> (U/mL, onde U =  $\mu$ mol de ácido graxo liberado por minuto) do sêmen caprino coletado nas épocas chuvosa e seca do ano. \*p < 0,05.

### 3.3 - Correlações entre parâmetros seminais e componentes bioquímicos do sêmen

A atividade da fosfolipase  $A_2$  não demonstrou correlação significativa com os parâmetros seminais avaliados para as duas épocas estudadas, entretanto foi observada a existência de baixa correlação positiva ( $r = 0,20$ ) entre esta variável e o percentual de espermatozóides com morfologia normal durante a época chuvosa (Tabela 4). No que diz respeito à correlação da atividade da FLA $_2$  com os outros componentes bioquímicos estudados, as correlações foram negativas e de baixas a moderadas (Tabela 5). A concentração de frutose mostrou correlações com o vigor espermático avaliado nos períodos chuvoso ( $r = 0,55$ ) e seco ( $r = 0,73$ ) e com a motilidade ( $r = 0,69$ ) e morfologia espermática normal ( $r = 0,65$ ) somente na época seca. O nível de frutose no sêmen correlacionou-se negativamente com a TDM nos dois períodos do ano, chuvoso ( $r = -0,59$ ) e seco ( $r = -0,78$ ; Tabela 4). As correlações entre as concentrações de ácido cítrico e proteínas totais com os valores de vigor, motilidade e TDM demonstraram comportamento semelhante àquelas envolvendo os níveis de frutose. No entanto, em relação à morfologia normal dos espermatozóides, observou-se uma correlação negativa na época chuvosa.

Os níveis de fósforo no plasma seminal apresentaram correlação com os parâmetros seminais apenas na época seca, sendo negativa para vigor ( $r = -0,60$ ) e motilidade ( $r = -0,59$ ) e positiva para TDM ( $r = 0,65$ ) e percentagem de espermatozóides com morfologia normal ( $r = 0,69$ ). A concentração de Mg correlacionou-se de forma moderada e positiva com a motilidade na época chuvosa e negativa com a normalidade da morfologia espermática na época seca (Tabela 4). Valores de cálcio quantificados no sêmen não apresentaram associações significativas com os parâmetros seminais avaliados.

**Tabela 4** – Correlações simples de Pearson para os parâmetros seminais do sêmen caprino resfriado a 4 °C e parâmetros bioquímicos do plasma seminal de caprinos coletados em época chuvosa e seca.

	Época	FLA <sub>2</sub>	Frutose	Ácido Cítrico	Proteínas Totais	Fósforo	Magnésio
<b>Vigor</b>	<b>Chuvosa</b>	ns	0,55*	0,66**	0,58*	ns	Ns
	<b>Seca</b>	ns	0,73***	0,59**	0,71***	-0,60**	Ns
<b>Motilidade</b>	<b>Chuvosa</b>	ns	Ns	0,57*	0,50*	ns	0,60**
	<b>Seca</b>	ns	0,69**	0,56*	0,76***	-0,59**	Ns
<b>TDM</b>	<b>Chuvosa</b>	ns	-0,59**	-0,70**	-0,47*	ns	Ns
	<b>Seca</b>	ns	-0,78***	-0,67**	-0,62**	0,65**	Ns
<b>Morfologia Normal</b>	<b>Chuvosa</b>	0,20**	ns	ns	ns	ns	Ns
	<b>Seca</b>	Ns	0,65**	-0,51*	-0,51*	0,69**	-0,48*

\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ns – não significativo.

**Tabela 5** – Correlações simples de Pearson para o nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> com as concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, Ca, P e MG no plasma seminal de caprinos coletados em época chuvosa e seca.

	Época	Frutose	Ácido Cítrico	Proteínas Totais	Ca	P	Mg
<b>FLA<sup>2</sup></b>	<b>Chuvosa</b>	-0,18**	-0,24***	ns	-0,28***	ns	Ns
	<b>Seca</b>	ns	-0,39***	-0,30***	-0,25***	ns	-0,31***

\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ns – não significativo.

## DISCUSSÃO

### 4.1 - Parâmetros seminais

No presente estudo, foi observada uma redução da qualidade seminal quanto maior o tempo de permanência do sêmen caprino diluído em água de coco com 2,5 % de gema de ovo e resfriado a 4 °C. Estes dados corroboram com os encontrados por outros autores para sêmen de animais da mesma espécie (FIGUEIRÊDO *et al.* 2002; CAMPOS *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2004; ISLAM *et al.*, 2005) e coincidem com a premissa de que, via de regra, menor será a sobrevivência das células espermáticas *in vitro* e a capacidade fecundante das mesmas *in vivo* quanto maior o tempo de armazenamento do sêmen (LEBOEUF *et al.*, 2000; LEBOEUF *et al.*, 2003). De fato, estudos mostram que, em média, as taxas de fertilidade de ovelhas podem ser reduzidas de 10 a 35% por cada dia em que o sêmen permanece sob resfriamento (SALAMON & MAXWELL, 2000). O declínio da qualidade seminal durante a conservação a 4 °C provavelmente deve-se à atividade metabólica dos gametas, com conseqüente redução dos nutrientes disponíveis e acúmulo de substâncias tóxicas, como o ácido láctico (VISHWANATH & SHANNON, 2000; ISLAM *et al.*, 2005), além da exposição das células espermáticas aos produtos da decomposição dos espermatozóides mortos, tendo em vista a ausência de mecanismos de eliminação dessas células e seus produtos (CORTEEL, 1980).

Avaliou-se também a ausência do efeito tempo de conservação do sêmen sobre a TDM durante a época chuvosa, porém, na época seca do ano, a TDM avaliada 2 horas após o início do resfriamento foi maior do que aquela encontrada às 48 horas. Ao contrário do encontrado neste experimento, estudos conduzidos com bodes da raça Saanen demonstraram não haver diferença significativa da TDM no sêmen resfriado a 4 °C por até 48 horas (FIGUEIRÊDO *et al.* 2002) ou 72 horas (CAMPOS *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2004). Neste estudo, a TDM foi provavelmente mais acentuada em T2 devido ao fato de que na primeira fase do teste de termorresistência (5 minutos), o vigor foi elevado em T2 quando comparado com T48, o que provavelmente permitiu uma diminuição mais acentuada do valor deste parâmetro no início do resfriamento. Na fase final da conservação do sêmen, ou seja, em T48, assume-se que o vigor espermático apresenta menor redução em virtude do metabolismo espermático já se encontrar com

atividade basal bastante reduzida. Esta condição, portanto, gera mudanças mais lentas no valor do vigor espermático.

Dado a existência de correlações significativas entre parâmetros de vigor e motilidade e a fertilidade dos animais *in vivo* (DAAS, 1992; SANTOS *et al.*, 2006), sugere-se que melhores taxas de fertilidade seriam alcançadas quanto mais cedo fosse utilizado o sêmen resfriado. Pode-se então considerar ainda a hipótese de que o vigor e a motilidade devem ser os primeiros parâmetros a serem considerados para avaliação do sêmen *in vitro* enquanto que o cálculo da TDM seria recomendado somente como um critério auxiliar para diferenciar o processo de seleção de reprodutores.

Estudos demonstraram o efeito de indivíduo sobre volume e concentração do ejaculado, motilidade e morfologia espermática (ROCA *et al.*, 1993), viabilidade espermática, fertilidade após inseminação artificial (ROCA *et al.*, 1997) e composição bioquímica do plasma seminal (CATUNDA, 2007). A existência de variabilidade individual relacionada a tais parâmetros permite a definição de grupos de animais com base nos mesmos e, conseqüentemente, fornece subsídios para processos de identificação e seleção de marcadores moleculares de fenótipos de interesse.

O vigor e a motilidade espermática foram mais elevados no período chuvoso durante a conservação do sêmen resfriado, enquanto a TDM apresentou-se com maiores valores na época seca do que na chuvosa, apenas em T2. Os valores médios de vigor e motilidade obtidos no TTR neste estudo foram menores que os encontrados por Campos *et al.* (2003; 2004) tanto para época chuvosa quanto para seca, entretanto a TDM foi similar, a não ser para aquela obtida em T2 da época seca, neste estudo. Em região de clima temperado, vários estudos demonstraram a influência da estação do ano sobre a reprodução de pequenos ruminantes, sendo a mesma regulada pelo fotoperíodo (COLAS, 1980; DELGADILLO *et al.*, 1993; KARAGIANNIDIS *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2006).

Em região de clima tropical, poucos estudos neste sentido foram desenvolvidos. Alguns autores demonstraram a influência da época do ano sobre a concentração de espermatozoides no ejaculado e circunferência escrotal de caprinos, sendo maiores na época chuvosa, enquanto menor número de anormalidades espermáticas foi obtido na época seca (LIMA *et al.*, 1994). Em carneiros deslanados não foi observado efeito da época de coleta do sêmen sobre testosteronemia, teor de frutose no plasma seminal, libido, volume do ejaculado e morfologia espermática (FREITAS & NUNES, 1992). Estes autores, apesar de observarem efeito positivo da época chuvosa sobre perímetro

escrotal, motilidade massal, pH do sêmen e concentração espermática, não desaconselharam o uso dos reprodutores durante a época seca. Em carneiros Somalis, não foi encontrado diferença significativa para motilidade massal, volume ou número de espermatozoides por ejaculado, vigor e motilidade espermática, pH do sêmen, além de outros parâmetros de mensuração testicular (volume, consistência, diâmetro e comprimento) avaliados coletado na época chuvosa ou seca (SIMPLÍCIO *et al.*, 1982). Já Campos *et al.* (2003; 2004), trabalhando com bodes Saanen, só observaram efeito de época para vigor em T2, sendo que motilidade e TDM não foram afetados pela época do ano. Dessa forma, estes autores concluíram que a época do ano não interferiu de forma significativa sobre a conservação do sêmen caprino da raça Saanen, quando se deseja preservá-lo resfriado a 4 °C.

Já é bem conhecido que temperaturas elevadas exercem efeitos depressivos sobre a qualidade seminal, com elevação do pH e anormalidades espermáticas, além de consequente diminuição do vigor, motilidade e concentração espermáticas, volume do ejaculado (CORTEEL, 1981; RIVER & RIVEST, 1991; MOREIRA *et al.*, 2001). Em regiões de clima tropical, os efeitos das épocas chuvosa ou seca podem interferir na disponibilidade de alimentos, na temperatura e nas atividades hipofisárias, influenciando a atividade sexual de pequenos ruminantes (SILVA & NUNES, 1984). Vários autores atribuem à alimentação a variação do desempenho reprodutivo de pequenos ruminantes nas regiões de clima tropical, devido à maior e melhor disponibilidade de alimentos durante o período chuvoso (SIMPLÍCIO *et al.*, 1982). Contudo, neste estudo os animais foram mantidos em baias individuais e a alimentação dos mesmos foi idêntica para ambas as épocas, de modo que as diferenças encontradas não podem ser atribuídas ao fator alimentar. Resultados similares aos divulgados no presente estudo foram encontrados também por Delgadillo *et al.* (1999), quando se demonstrou que em caprinos da raça Crioula apresentaram o mesmo ritmo na atividade reprodutiva entre as diferentes épocas do ano, mesmo quando criados em região subtropical do México e alimentados com idêntica dieta. Em regiões de clima tropical, a temperatura e a interação da mesma com a umidade relativa do ar parecem ser fatores fundamentais relacionados ao conforto térmico dos animais, com potenciais efeitos sobre os aspectos quantitativos e qualitativos do sêmen. No caso do presente estudo, o período seco do ano apresentou temperaturas mínimas e máximas mais elevadas do que o período chuvoso (em torno de 1 °C). É provável, portanto, que tais diferenças, embora de reduzida magnitude, estejam relacionadas com as variações dos parâmetros seminais

durante os respectivos períodos do ano. No entanto, como os valores de ITU foram similares nas fases seca e chuvosa, não se deve descartar a hipótese de que outros índices climáticos, como por exemplo, horas de sol/dia, intensidade de radiação solar e velocidade dos ventos, possam ter interferido na fisiologia dos animais ao longo do ano.

Foi observado efeito de época sobre a morfologia espermática, de forma que na época chuvosa obteve-se maior quantidade de espermatozóides com morfologia normal. Porém, o sêmen coletado e resfriado na época seca do ano ainda apresentou padrão de qualidade satisfatória, ou seja, mínimo de 80% de espermatozóides normais, para utilização em inseminação artificial (CBRA, 1998). O efeito da época do ano sobre a morfologia espermática foi também descrito por Lima *et al.* (1994), porém com resultados contrários aos descritos no presente trabalho, com valores maiores deste parâmetro observados na época seca do ano e não no período chuvoso. Embora diferentes, os resultados destes dois estudos não se apresentam como contraditórios ou inválidos, porque houve variações nas condições de manejo em que os animais experimentais foram observados e tipos de raças diferentes. Outros autores não observaram influencia de épocas do ano sobre a morfologia espermática, tanto em região de clima tropical (SILVA & NUNES, 1984) quando em clima temperado (COLAS, 1980). Evidencia-se, nestes casos, uma grande variabilidade na forma pela quais as características reprodutivas dos caprinos podem responder a variações no ambiente, em função da raça, adaptabilidade dos animais, temperaturas, umidade relativa do ar média, máximas e mínimas, bem como as interações entre estes fatores.

#### **4.2 – Parâmetros bioquímicos do plasma seminal**

As concentrações de frutose, ácido cítrico, proteínas totais, fósforo e magnésio no plasma seminal dos caprinos foram mais elevadas no período das chuvas do que na época seca do ano, enquanto a fosfolipase A<sub>2</sub> apresentou menor atividade na época chuvosa. Em relação à concentração de frutose e ácido cítrico no plasma seminal caprino, já foi anteriormente descrito efeito de época, tanto em regiões de clima temperado (ROCA *et al.*, 1993) quanto em clima tropical (CATUNDA, 2007; PINHEIRO *et al.*, 1996; PINHEIRO *et al.*, 1996b). Também tem sido observado efeito de época para a concentração de frutose no plasma seminal de carneiros (GIRÃO & MIES FILHO, 1989). As diferenças nas concentrações de frutose e ácido cítrico no plasma seminal podem ocorrer devido a vários fatores, os quais incluem a composição

genética do indivíduo, influência ambiental, método de coleta do sêmen e frequência das ejaculações (ROCA *et al.*, 1993). Aqueles componentes são sintetizados prioritariamente pelas glândulas sexuais anexas e, no caso do presente estudo, sugere-se que, dada a regulação destas glândulas pela ação de andrógenos (GONZÁLEZ, 2002), a época do ano (tanto em clima temperado como em tropical) interfere sobre a síntese e liberação de GnRH (RIVER & RIVEST, 1991) e, por conseguinte, sobre a composição bioquímica do plasma seminal. Outros autores também observaram efeitos da época do ano sobre as concentrações de proteínas totais no plasma seminal de caprinos criados em clima subtropical (LA FALCI *et al.*, 2002) e tropical (CATUNDA, 2007) e de ovinos mantidos em clima temperado (CARDOZO *et al.*, 2006).

O presente trabalho é o primeiro a quantificar a atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> no sêmen de caprinos de regiões tropicais, além do fato de que a maior atividade da FLA<sub>2</sub> foi observada no período seco, justamente quando o sêmen apresentou vigor e motilidade inferiores e com menores concentrações de vários componentes bioquímicos. Estudos anteriores demonstram a significância do efeito de época do ano sobre a atividade da FLA<sub>2</sub>, porém, tais experimentos foram conduzidos em regiões de clima temperado (SIAS *et al.*, 2005; NUNES, 1982) e subtropical (La FALCI *et al.*, 2002) o que limita, por conseguinte, comparações com os resultados obtidos nesta pesquisa. A maior atividade da FLA<sub>2</sub> durante o período seco pode estar relacionada ao fato de que, justamente neste período, houve uma redução na qualidade seminal e, por conseguinte, na incidência de células degeneradas. Em suporte a tal hipótese, estudos têm mostrado de fato que a FLA<sub>2</sub> é expressa em resposta a processos de degeneração celular em tecidos (KALLAJOKI *et al.*, 1998).

Sugere-se a existência de um modulador da atividade da FLA<sub>2</sub>, cuja expressão varia entre as épocas do ano e que deve estar ausente (ou diminuída) na época não reprodutiva dos caprinos criados nas regiões subtropicais (La FALCI *et al.*, 2002). Dando suporte a essa idéia, Upreti *et al.* (1999) identificaram em sêmen de carneiro uma proteína de alto peso molecular (105 a 175 KDa) com capacidade de inibir a atividade da FLA<sub>2</sub>. Portanto, no caso da região tropical, propõe-se a hipótese de que a presença dessas proteínas inibidoras seria mais expressiva durante a época chuvosa ocasionando, portanto os resultados detectados no presente estudo.

No trabalho atual, não foi encontrado efeito de época do ano sobre a concentração de cálcio no plasma seminal, mas sim de fósforo e magnésio. Catunda (2007) e Pinheiro *et al.* (1996b) também observaram os mesmos resultados com relação

à concentração destes minerais. Ao contrário dos outros componentes discutidos acima (ácido cítrico, frutose e proteínas), os minerais não são sintetizados pelos organismos vivos, mas sim, secretados para os fluidos através de sistemas específicos localizados nas células dos tecidos e apresentam diversas funções nos sistemas reprodutivos, tais como regulação da atividade de enzimas intra e extracelulares, proteínas de membranas, sistemas de mensageiros secundários, receptores e metabolismo energético (SMITH & AKINBAMIJO, 2000; SENGER, 2002). Conforme já discutido neste trabalho, a variabilidade sazonal nas concentrações de P e Mg do plasma seminal dos caprinos não pode ser atribuída a mudanças em padrões de alimentação, manejo ou sistemas de coleta dado que estas características foram controladas em ambas os períodos experimentais, ou seja, durante as épocas chuvosa e seca do ano. Portanto, sugere-se também neste caso que a maior atividade das glândulas sexuais anexas e epidídimo durante a época chuvosa têm consequências não somente sobre o transporte de frutose e ácido cítrico e expressão de genes, mas também sobre a absorção e transporte de minerais (P e Mg).

#### **4.3 – Correlações entre parâmetros seminais e componentes bioquímicos do sêmen**

A correlação positiva entre o vigor e a motilidade espermática com a concentração de frutose pode ser explicada pelo fato deste açúcar constituir-se em componente seminal importante para o metabolismo espermático e sua concentração refletir-se na qualidade espermática, atividade metabólica e na função secretora normal da glândula vesicular (DHAMI & SHANI, 1993; STABENFELDT & EDQUIST, 1996). Em animais de fecundação interna, a frutose é a principal fonte de energia para os espermatozoides (BACILA, 1980). Estes resultados estão de acordo com o fato da concentração de frutose ter uma correlação negativa com a TDM.

As correlações observadas entre as concentrações de ácido cítrico e proteínas totais do plasma seminal e os parâmetros espermáticos foram semelhantes às observadas com a frutose. O ácido cítrico é um dos principais constituintes do plasma seminal ocorrendo em altas concentrações no sêmen da maioria das espécies de mamíferos, sendo importante fonte de energia para o metabolismo dos espermatozoides, além de possuírem função tamponante (MANN, 1974; MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

A razão da existência de correlações positivas entre as proteínas totais do plasma e qualidade espermática deve-se às importantes funções exercidas por tais proteínas no processo reprodutivo de várias espécies. Sabe-se que proteínas seminais contribuem

para a manutenção da motilidade de espermatozóides bovinos e ovinos, além de permitirem proteção das membranas durante armazenamento a baixas temperaturas (BARRIOS *et al.*, 2000; PEREZ-PE *et al.*, 2001). Proteínas seminais também exercem efeitos sobre a capacitação espermática, motilidade, função da ATPase celular, proteção dos espermatozóides contra bactérias, reações imunológicas, processos oxidativos e precipitação de proteínas, reação acrossômica e interação com ovócitos (MOURA *et al.*, 2007). Proteínas seminais conhecidas como BSP, presentes em consideráveis quantidades tanto em bovinos quanto em ovinos e caprinos (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002; VILLEMURE *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2007), também possuem a capacidade de mediar a interação dos espermatozóides com o epitélio do oviduto, garantir a motilidade e viabilidade das células no trato reprodutivo da fêmea (GWATHMEY *et al.*, 2003). Portanto, a associação empírica entre as concentrações das proteínas seminais e parâmetros de motilidade nos caprinos deve-se à combinação de vários atributos de tais proteínas, conforme descrito acima. Embora o vigor e a motilidade espermática e proteínas do sêmen apresentassem maiores níveis durante o período chuvoso, a significância das correlações parece permanecer sem alteração devido ao período do ano, o que sugere uma manutenção das funções das mesmas independente de fatores climáticos e resposta dos animais aos mesmos. Proteínas espermáticas localizadas na peça intermediária e no acrossoma de espermatozóides, relacionadas com sua habilidade fertilizante quando liberadas em grandes quantidades podem causar danos à membrana espermática (BITTMAR & KOSINIAK, 1992), o que pode explicar a correlação negativa observada entre a concentração de proteínas totais e normalidade da morfologia espermática.

Ao contrário dos demais componentes bioquímicos do plasma seminal, o fósforo apresentou correlação negativa com vigor e motilidade e positiva com os resultados de TDM, mas somente na época seca do ano, mesmo neste período tendo sido registradas as menores concentrações deste mineral. A razão de tal resultado não é clara, dados os processos fisiológicos dos quais participam o fósforo. No entanto, se este elemento exerce algum efeito deletério sobre a qualidade espermática durante o período seco, tal evento deve ser inibido pela ação de algum outro componente presente no plasma seminal por ocasião da época chuvosa, caracterizada por temperaturas mais amenas, maior umidade relativa do ar e menor incidência de radiação solar. Estudos necessitam ser conduzidos, portanto, com a finalidade de avaliar com mais detalhe os efeitos destes componentes do plasma seminal sobre a função espermática em condições laboratoriais

controladas. Contrariamente ao encontrado para caprinos neste trabalho, Abdel-Rahman *et al*, (2000) detectaram correlação positiva entre o fósforo e a motilidade de espermatozóides ovinos.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que os caprinos sem padrão racial definido, quando criados em clima quente e úmido, apresentam melhor qualidade espermática durante os meses chuvosos do que no período em que a precipitação é praticamente inexistente. Portanto, sugere-se que os caprinos podem apresentar melhor desempenho reprodutivo na época das chuvas e que esta é também o melhor período para a coleta e conservação do sêmen. Tal informação implica também que a utilização de reprodutores na época seca, quando o ambiente torna-se mais propício a situações de estresse térmico, deve exigir práticas diferenciadas de manejo. A manipulação de amostras de sêmen para inseminação artificial ou fertilização *in vitro* neste período do ano também exigirá o desenvolvimento de protocolos específicos para prevenir decréscimos significativos na capacidade fecundante das células espermáticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUIAR, G.V.; CELES, C.K.S.; MONTEIRO, A.W.U.; CAMPOS, A.C.N.; AIRTON, A.A. Buck individual effect on the motility degradation rate of the semen cooled at 4 °C and stored for 48 hours. Abstracts. **Annals of International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, Nov. 15-18, 2006, Belo Horizonte, Brazil. p. 261, 2006.

AMIR, D.; GACITUA, H.; RON, M.; LEHRER, A. R.; Seasonal variation in semen characteristics and the fertility of Finn cross rams subjected to frequent ejaculation. **Animal Reproduction Science**, v. 10, p. 75-84, 1986.

BACILA, M. Bioquímica da Reprodução. In: **Bioquímica Veterinária**. São Paulo: J.M. Varela Livros, 1980. cap. 14. p. 395.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGRO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531-1537, 2000.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n.1, p. 27-37, 2006.

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

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

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U; FIGUEIRÊDO, 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, resfriado e armazenado a 4 °C. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n 3, p. 178-182, 2004.

CARDOZO, J.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, 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. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª ed. Belo Horizonte/MG, p. 6-49, 1998.

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

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

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

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

DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 87-94, 1992.

De HAAS, G.H.; POSTEMA, N.M. NEIUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 159, n 1, p. 103-17, 1968.

DHAMI, A.J.; SAHNI, A.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.

DELGADILLO, J. A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. **Reproduction Nutrition Development**, v. 33, p. 609-617, 1993.

DELGADILLO, J. A.; CANEDO, G. A.; CHEMINEAU, P.; GUILLAUME, D.; MALPAUX, B. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. **Theriogenology**, v. 52, p. 727-737, 1999.

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

FAN, J.; LEFEBVRE, J.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. **Gene**, v. 21, p. 63-74, 2006.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; CAMPOS, A.C.N.; MONTEIRO, A.W.U; SILVA FILHO, A.H.S. Viabilidade *in vitro* do sêmen caprino Saanen diluído em água de coco e resfriado a 4 °C. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v. 5, n. 1, p. 31-38, 2002.

FREITAS, V. J. F.; NUNES, J. F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 16, p. 95-104, 1992.

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

GIRÃO, R.N.; MIES FILHO, A. Teores de frutose e de AC no sêmen de carneiros da raça Corriedale, submetidos a fotoperíodo e temperaturas naturais e artificiais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 13 (3), p. 137-142. 1989.

GONZÁLEZ, F.H.D. Endocrinologia reprodutiva do macho. IN: GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, p. IV 1-13, 2002.

GWATHMEY, T.M., IGNOTZ, G.G., SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology Reproduction**. v. 69, p. 809-15, 2003.

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

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

KALLAJOKI, K.A.; ALANEN, K.A.; NEVALAINEN, M.; NEVALAINEN, T.J. Group II phospholipase A<sub>2</sub> in human male reproductive organs and genital tumors. **Prostate**, v. 35, p. 263-272, 1998.

KARAGIANNIDIS, A. ; VARSAKELI, S. ; KARATZAS, G. ; Characteristics and seasonal variations in the semen of alpine, saanen and damascus goat bucks born and raised in greece. **Theriogenology**, v. 53, p. 1285-1293, 2000.

KILLIAN, G.J. ; CHAPMAN, D.A. ; CANCEL, A.M. ; GERENA, R.L. ; RODRIGUEZ, C.M. ; DAY, J.R. Male factors affecting sperm fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.2, 1999.

KJAESTAD, H., ROPSTAD, E., BERG, K.A.. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Vet. Scand.**, v. 34, p. 299-303, 1993.

LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRÍGUEZ, J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of gota seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1035 – 1048, 2002.

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

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

LIMA, S.; MORAES, G. V.; MOREIRA, H. L. M.; MACEDO, F. A. F.; MACEDO, L. G. P. Avaliação de épocas do ano sobre as características do sêmen de caprinos antes e após a congelação. **Revista Unimar**, v. 16, p. 181-194, 1994.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, P. 109-119, 2002.

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

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Studies on the metabolism of semen: 4. Aerobic and anaerobic utilization of fructose by spermatozoa and seminal vesicles. **Biochemical Journal**, v. 43 (2), p. 266-270. 1948.

MOREIRA, E.P.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO, A.A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 6, p.1704-1711, 2001.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p.169-188, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirement of domestic animals: nutrient requirement of goats**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1981. 91p.

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

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 22, n. 2 p. 109-112, 1998.

OBEGE, P.O.; OGUNMODEDE, B.K.; McDOWELL, L.R. Behavioral and physiological responses of Nigerian dwarf goats to seasonal changes of de humid tropics. **Small Ruminant Research**, v. 22, n3, p. 213 - 217, 1996.

PAW, I.M.C.; SOOM, A.V.; MAES, D.; VERBERCKMOES, S.; KRUIF, A. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, p. 1109-1122, 2003.

PEREIRA, J.C.C. Alternativas para amenizar os efeitos do estresse calórico em vacas leiteiras. IN: **Fundamentos de Bioclimatologia aplicados à produção animal**. Minas Gerais: FEMVZ, 2005. p 120-125.

PEREZ-PE R.; MUINO-BLANCO T.; CEBRIAN-PEREZ J. A. Sperm washing method alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **International Journal of Andrology**, v. 24, p. 352-359, 2001.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, nº 3, p. 215-225, 2005.

RIVER, C.; RIVERST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 523-532, 1991.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Ruminant Research**, v. 225, p. 147 – 153, 1997.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VÁSQUEZ, J. M. Seasonal variations in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciana-Granadina goats. **Small Ruminant Research**, 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.

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

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para a avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 1934-1942, 2006.

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

SENGER, C.C.D. **Papel dos minerais como cofatores enzimáticos**. 2002. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/minerais.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2008.

SHAMSUDDIN, M.; AMIRI, Y.; BHUIYAM, M. M. U. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p. 53-57, 2000.

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

SILVA, A.E.D.F.; NUNES, J.F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslançados das raças Santa Inês e Somalis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 8, p. 207-214, 1984.

SIMPLICIO, A. A.; RIERA, G. S.; NELSON, E. A.; PANT, K. P. Seasonal variation in seminal and testicular characteristics of Brazilian Somali rams in the hot semi-arid climate of tropical northeast Brazil. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 66, p. 735-738, 1982.

SINGH, M. P.; SINHA, A. K.; SINGH, B. K.; Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 1047-1053, 1995.

SMITH, O.B.; AKINBAMIJO, O.O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 549-560, 2000.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Processos Reprodutivos da Fêmea. In: SWENSON, M. J.; REECE, W., Dukes **Fisiologia dos Animais Domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 36, p. 615-644. 1996.

STORNELLI, M. C.; TITTARELLI, C. M.; SAVIGNONE, C. A.; STORNELLI, M. A. Efecto de os procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v. 25 (2), p. 28-35, 2005.

TRUMMER, H.; TUCKER, K.; YOUNG, C.; KAULA, N.; MEACHAM, R.; B. Effect of storage temperature on perm cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 70 n. 6, 1998.

UPRETI, G.C.; HALL, E.L. KOPPENS, D. OLIVER, J.E. VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and PLA<sub>2</sub> inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 107-121, 1999.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALMEIDA, A.K.; PORTELA, A.P.M.; BITTENCOURT, R.F.; ALVEZ, S.G.G.; BITTENCOURT, T.C.C.; QUINTELA, A.T. 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**, 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**, v. 1, p. 39-48, 2003.

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

WATSON, P.; F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

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

## **CAPÍTULO 3**

**Atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal de caprino e  
conservação do sêmen a 4° C em latitude equatorial**

**(Phospholipase A<sub>2</sub> activity in the goat seminal plasma and semen  
conservation at 4 °C in equatorial latitude)**

## RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar se o nível de atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (PS) de caprinos pode ser utilizada como indicativo da qualidade espermática. Foram utilizados oito caprinos divididos dois grupos de acordo com o nível de atividade da FLA<sub>2</sub> no PS: grupo I (< 6,7U/mL) e grupo II (> 11,0/mL). O sêmen foi coletado semanalmente, diluído e dividido em duas alíquotas. A primeira constituiu o tratamento controle (sêmen não lavado), e a segunda foi centrifugada para remoção do PS (sêmen lavado); os dois tratamentos foram conservadas a 4 °C por até 48h. Uma amostra de cada tratamento foi avaliada quanto ao vigor e motilidade a 0 (fresco), 2, 12, 24 e 48 horas de resfriamento, pelo teste de termorresistência (TTR). Esfregaços do sêmen foram confeccionados e corados durante o TTR, 200 células foram avaliadas classificadas como morfolologicamente normais ou anormais. A qualidade espermática diminuiu à medida que se prolongou o tempo de conservação do sêmen (p<0,0001). A lavagem do sêmen incrementou a qualidade seminal, principalmente para o grupo I. Já o nível de atividade da FLA<sub>2</sub> não influenciou a qualidade seminal, exceto para a motilidade do sêmen lavado em T48 e do sêmen não lavado em T24. Concluiu-se que o nível da atividade da FLA<sub>2</sub> no PS caprino não pode ser utilizado como indicativo da qualidade espermática.

## ABSTRACT

This study aimed to verify if the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activity level in seminal plasma (SP) of the goats can indicate the spermatoc quality. Eight bucks were separate in two groups according if the PLA<sub>2</sub> activity level: group I (< 6,7 U/mL) e group II (> 11,0 U/mL). The ejaculate was collected weekly, diluted (200 x 10<sup>6</sup> sperm/mL) and separate in two aliquots: the first aliquot was the control treatment (non-washed semen) and the second aliquot was centrifuged at 550 g for 10 minutes to remove the SP (washed semen) and both aliquots were stored at 4 °C for 48 hours. A sample of the each treatment was incubated at 37 °C and evaluated to vigor and motility at 0, 2, 12, 24 and 48 hours of cooling by thermoresistance test (TRT). Slides of sperm were made during TRT and 200 cells were classified as normal or abnormal morphology. The semen quality decreased with storage time (p<0,001). The semen wash increased the spermatoc quality, mainly in the group I. The PLA<sub>2</sub> activity level did not influence the spermatoc quality in the ejaculate spermatozoa, except for the semen motility of the washed semen at 48h and of the non-washed semen at 24h. In conclusion, the PLA<sub>2</sub> activity level cannot be used as an indicative of the spermatoc quality in the ejaculate spermatozoa of male goats raised in tropical region.

## INTRODUÇÃO

Várias pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de desvendar os efeitos da composição bioquímica do plasma seminal sobre os espermatozóides e sua conservação (RODGER, 1975; DHAMI & SAHNI, 1993; HENAULT *et al.*, 1995; AURICH *et al.*, 1996), visto que, esta secreção das glândulas anexas exercem alterações sobre as células espermáticas imediatamente após entrarem em contato com as mesmas, ou seja, no momento da ejaculação (YAMASHIRO *et al.*, 2006). A lavagem do sêmen, logo após a sua coleta, produz efeitos positivos à sobrevivência espermática tanto para o sêmen resfriado (VIANA *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2004), como para o sêmen congelado (CORTEEL, 1974).

Em regiões de clima temperado, o fotoperíodo exerce influência sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (MARKUS *et al.*, 2002), alterando a síntese e liberação de testosterona que, por sua vez, regula a atividade das glândulas sexuais anexas, inclusive as bulbouretrais cuja secreção é rica em fosfolipase A<sub>2</sub> (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997; NUNES, 1982). A fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) é uma enzima que catalisa a hidrólise das lecitinas presentes na gema de ovo (um dos constituintes utilizados para preparo de diluentes do sêmen para resfriamento e congelação) em ácidos graxos e lisolecitinas (UPRETI *et al.*, 1999). Estes componentes são tóxicos para sobrevivência dos espermatozóides (ROY, 1957).

Contudo, em regiões de clima tropical, não existem estudos sobre a atividade desta enzima e seus efeitos sobre a qualidade espermática do sêmen caprino resfriado. Dessa forma, foi objetivo deste trabalho verificar o efeito da atividade de FLA<sub>2</sub> sobre a qualidade do sêmen e se esta ação pode ser um fator utilizado como indicativo de boa ou má qualidade de conservação do sêmen no estado líquido, em latitude equatorial.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Local do Experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, Fortaleza/CE, a uma latitude sul de 3°45', longitude oeste de 38°32' e altura de 15,5 m acima do nível do mar. O clima da cidade, de acordo com a classificação de Koppen, é AW, com clima quente e úmido. O período experimental transcorreu nos meses de março e abril de 2007, apresentando neste período temperatura média de 27,7 °C, com amplitude de 24,6 a 30,3 °C, umidade relativa do ar de 83,5% e precipitação média de 264,1mm.

### 2. Animais Experimentais, coleta e avaliação do sêmen

Foram utilizados oito caprinos sem padrão racial definido (SPRD), com idade média de 32 meses e peso médio de 45 Kg. Durante o experimento, os animais foram manejados em baias individuais, alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylum*) e concentrado adicionado de sal mineral, dividido em duas ofertas diárias (NRC, 1981), água foi fornecida à vontade.

O sêmen dos animais foi coletado em vagina artificial com tubo graduado acoplado. Uma cabra foi usada como manequim para monta dos animais. Antes da coleta, o prepúcio foi higienizado para evitar contaminação do sêmen com impurezas.

Os ejaculados dos animais foram coletados uma vez por semana, durante seis semanas, totalizando 48 amostras. De cada uma destas, uma alíquota de 300 µL foi separada e centrifugada para obtenção do plasma seminal, que foi acondicionado em tubos “eppendorffs” devidamente identificados e congelado a -18 °C, para posterior determinação da atividade da FLA<sub>2</sub>. Na amostra restante, foram determinados o volume e a concentração, através de espectrofotometria, e posteriormente, o sêmen foi diluído a uma concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL, utilizando diluidor à base de água de coco *in natura* com 2,5% de gema (NUNES, 1998).

Logo em seguida, o sêmen diluído foi dividido em duas alíquotas. A primeira alíquota constituiu o tratamento controle (sêmen não lavado), de onde foi retirada uma amostra de 250 µL de sêmen (sêmen fresco – T0) que foi incubada em banho-maria a

38 °C para realização do teste de termorresistência lenta (TTR – CHENINEAU *et al.*, 1991; CBRA, 1998) e o restante das alíquotas foram resfriadas a 4 °C, por até 48h e constituíram os tempos de conservação T2, T12, T24 e T48. A segunda alíquota foi centrifugada duas vezes a 550 g durante 10 minutos para a remoção do plasma seminal, ou seja, o sobrenadante foi desprezado e em seguida retomando exatamente o volume inicial pelo acréscimo do mesmo diluidor. Desta forma foi realizado o tratamento de sêmen lavado. Uma amostra deste tratamento (T0: 250 µL) foi incubada em banho-maria conforme descrito para o tratamento controle e o restante do sêmen, da segunda alíquota, foi resfriado sob as mesmas condições do sêmen não lavado.

Em cada tempo de conservação do sêmen a 4 °C (2, 12, 24 e 48 horas), foi retirada uma amostra de 250 µL de sêmen resfriado que foi incubada a 38 °C em banho-maria e uma gota (5 µL) do sêmen foi então posta sobre lâmina e coberta com lamínula, e levada ao microscópio ótico para avaliação do vigor e motilidade aos 5, 60 e 120 minutos de incubação.

Após a realização do TTR, a taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada, utilizando a seguinte fórmula:

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

Nos dois tratamentos (sêmen lavado e não lavado) e nos diferentes tempos de conservação (T0, T2, T24 e T48) foram realizados esfregaços de sêmen aos 5 e 120 minutos de incubação em banho-maria. Os esfregaços foram corados com azul de bromofenol e nas lâminas coradas foram observadas 200 células no aumento de 1000x e a morfologia espermática foi classificada segundo Colas (1980), para verificar as possíveis alterações provocadas pela ausência ou presença de plasma seminal.

#### **4. Determinação da atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub>**

A atividade da FLA<sub>2</sub> foi mensurada através de adaptações da metodologia de De Haas *et al.* (1968). Como substrato, preparou-se uma solução de uma gema de ovo com 50mL de água destilada e a uma amostra de 15mL desta solução foi adicionado 10 mL de deoxicolato de sódio a 0,03 M e 1 mL de CaCl<sub>2</sub> a 0,6 M. Água destilada foi em seguida adicionada até completar 100 mL, de forma que a concentração final do

deoxicolato de sódio e o  $\text{CaCl}_2$  foram de  $3 \times 10^{-3}$  e  $6 \times 10^{-3}$ , respectivamente. O pH desta solução foi corrigido para 7,8 a 8,0 utilizando-se NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 10mL desta solução foi retirada e levada ao pHmêtro e adicionada de 20  $\mu\text{L}$  de plasma seminal caprino. Uma alíquota 3  $\mu\text{L}$  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 3 minutos.

No final do ensaio, foi calculada a média das diferenças dos tempos anotados e multiplicada por um fator de correção com a finalidade de determinar a unidade de consumo de NaOH/minuto/20  $\mu\text{L}$  de plasma seminal caprino adicionado à solução de uso. A determinação da atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal foi realizada em triplicata e a média dos três resultados foi utilizada para as análises estatísticas.

Com base na determinação da atividade da FLA<sub>2</sub>, os reprodutores foram divididos em dois grupos, o grupo I foi composto por 05 animais cujo sêmen foi caracterizado por conter baixa atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (<6,70 U/mL, com média de  $6,33 \pm 1,24$ ) e o grupo II foi composto por 03 animais com alta atividade de FLA<sub>2</sub> (>11,00 U/mL, com média de  $12,30 \pm 3,55$ ), sendo detectada diferença estatística na atividade dessa enzima entre os dois grupos.

## **5. Análises estatísticas**

Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS<sup>®</sup>, versão 8.0. Os parâmetros espermáticos (vigor, motilidade e TDM) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para testar os efeitos de tempo, tratamento (lavado e não lavado), grupo (baixa e alta atividade da FLA<sub>2</sub> no PS) e interação entre tratamento e grupo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As variáveis motilidade e TDM sofreram transformação angular para atender à condição de normalidade.

## RESULTADOS

As médias e desvios padrão dos parâmetros seminais obtidos nos cinco tempos de conservação do sêmen lavado e não lavado de caprinos com baixa ou alta atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal estão apresentados na tabela 1, 2 e 3.

Em relação ao tempo de conservação, o vigor, nos grupos I e II, diminuiu significativamente ( $p < 0,0001$ ) em T48 no sêmen lavado e em T24 no tratamento não lavado. Foi observada uma diminuição significativa ( $p < 0,0001$ ) na motilidade dos espermatozoides nos grupos I e II no sêmen lavado a partir de T48, enquanto no sêmen não lavado, esse comportamento foi obtido em T24 no grupo I e em T2, no grupo II. A TDM não sofreu influência do tempo de conservação ( $p > 0,05$ ) exceto no sêmen não lavado dos animais do grupo I ( $p < 0,05$ ), em T48. No sêmen lavado foi constatada uma diminuição na incidência de alterações morfológicas totais (AMT) em T12 do grupo I ( $p < 0,05$ ).

Com referência ao tratamento, a lavagem do sêmen promoveu um incremento na qualidade seminal em ambos os grupos, todavia foi mais evidente no grupo I para os parâmetros de vigor, motilidade e TDM (tabela 1 e 2).

Nenhum efeito de grupo (baixa ou alta atividade da FLA<sub>2</sub>) foi observado no sêmen lavado ou não lavado ( $p > 0,05$ ), para os parâmetros de vigor, TDM ou AMT, nos grupos I ou II. Para o parâmetro de motilidade, foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas em T48 do sêmen lavado e T24 do sêmen não lavado.

**Tabela 1** – Efeito da lavagem sobre a conservação do sêmen caprino com alta ou baixa atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal, diluído e resfriado a 4° C e estocado por 48 horas sobre os parâmetros seminais de vigor e motilidade.

Parâmetros	Vigor				Motilidade			
	Grupo I		Grupo II		Grupo I		Grupo II	
Tempo (h)	Lavado	Não Lavada	Lavado	Não Lavado	Lavado	Não Lavado	Lavado	Não Lavado
0	2,93 ± 0,32 <sup>aA</sup>	2,50 ± 0,74 <sup>aB</sup>	2,81 ± 0,50 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,64 <sup>a</sup>	73,78 ± 5,45 <sup>a</sup>	64,95 ± 15,83 <sup>a</sup>	69,03 ± 10,56 <sup>a</sup>	62,92 ± 16,91 <sup>a</sup>
2	2,93 ± 0,32 <sup>Aa</sup>	2,46 ± 0,67 <sup>aB</sup>	2,79 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,67 <sup>a</sup>	72,61 ± 6,06 <sup>a</sup>	62,83 ± 15,46 <sup>a</sup>	66,94 ± 11,41 <sup>a</sup>	59,17 ± 15,38 <sup>a</sup>
12	2,81 ± 0,39 <sup>aA</sup>	2,23 ± 0,89 <sup>abB</sup>	2,65 ± 0,75 <sup>aA</sup>	2,06 ± 1,10 <sup>abB</sup>	71,00 ± 07,28 <sup>aA</sup>	58,67 ± 19,82 <sup>abB</sup>	64,31 ± 14,92 <sup>a</sup>	49,86 ± 23,70 <sup>ab</sup>
24	2,57 ± 0,51 <sup>abA</sup>	1,96 ± 1,01 <sup>bcB</sup>	2,36 ± 0,89 <sup>abA</sup>	1,65 ± 1,12 <sup>bbB</sup>	65,33 ± 12,12 <sup>abA</sup>	51,89 ± 23,79 <sup>abB2</sup>	55,97 ± 21,48 <sup>abA</sup>	41,39 ± 27,17 <sup>bcB1</sup>
48	2,28 ± 0,59 <sup>ba</sup>	1,70 ± 1,09 <sup>cb</sup>	1,86 ± 1,11 <sup>b</sup>	1,49 ± 1,13 <sup>b</sup>	59,06 ± 13,57 <sup>ba2</sup>	44,11 ± 27,58 <sup>bb</sup>	45,83 ± 25,15 <sup>b1</sup>	37,22 ± 27,77 <sup>c</sup>

Letras minúsculas – comparação entre tempos, dentro do mesmo grupo e tratamento, na mesma coluna.

Letras maiúsculas – comparação entre tratamentos (lavado x não lavado), dentro do mesmo grupo, na mesma linha.

Números – comparação entre grupos (baixa e alta atividade de FLA<sub>2</sub>), dentre do mesmo tratamento, na mesma linha.

Grupo I - Baixa atividade de FLA<sub>2</sub> (< 6,70 U/mL) e o grupo II alta atividade de FLA<sub>2</sub> (> 11,00 U/mL), no plasma seminal. (p < 0,05)

**Tabela 2** – Efeito da lavagem sobre a conservação do sêmen caprino com alta ou baixa atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal, diluído e resfriado a 4° C e estocado por 48 horas sobre a taxa de degradação da motilidade (TDM).

Grupo	Taxa de degradação da Motilidade (TDM)			
	Grupo I		Grupo II	
Tempo (h)	Lavado	Não Lavado	Lavado	Não Lavado
0	22,20 ± 16,08 <sup>A</sup>	45,42 ± 35,66 <sup>AB</sup>	28,42 ± 23,41	49,92 ± 36,16
2	22,66 ± 15,69 <sup>A</sup>	44,64 ± 35,69 <sup>AB</sup>	32,19 ± 25,25	50,60 ± 36,18
12	24,86 ± 20,19 <sup>A</sup>	40,16 ± 35,21 <sup>AB</sup>	28,65 ± 26,50	42,47 ± 37,22
24	25,52 ± 20,82 <sup>A</sup>	38,16 ± 36,19 <sup>AB</sup>	30,39 ± 29,30	37,33 ± 37,14
48	25,23 ± 22,01	22,32 ± 27,66 <sup>b</sup>	34,33 ± 27,71	39,93 ± 30,72

Letras minúsculas – comparação entre tempos, dentro do mesmo grupo e tratamento, na mesma coluna.  
 Letras maiúsculas – comparação entre tratamentos, dentro do mesmo grupo e tempo, na mesma linha.  
 Grupo I - Baixa atividade de FLA<sub>2</sub> (< 6,70 U/mL) e o grupo II alta atividade de FLA<sub>2</sub> (> 11,00 U/mL), no plasma seminal. (p < 0,05)

**Tabela 3** - Efeito da lavagem sobre a conservação do sêmen caprino com alta ou baixa atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal, diluído e resfriado a 4° C e estocado por 48 horas sobre as alterações morfológicas totais (%).

Grupo	Alterações Morfológicas Totais (%)			
	Grupo I		Grupo II	
Tempo (h)	Lavado	Não Lavado	Lavado	Não Lavado
0	14,49 ± 9,50 <sup>a</sup>	12,48 ± 6,18	14,12 ± 8,31	10,71 ± 4,45
2	13,28 ± 8,10 <sup>a</sup>	11,46 ± 6,43	14,96 ± 7,56	12,40 ± 6,40
12	8,97 ± 3,13 <sup>cB</sup>	12,67 ± 8,29 <sup>A</sup>	11,26 ± 5,05	12,77 ± 9,10
24	10,69 ± 3,94 <sup>bc</sup>	9,99 ± 4,26	9,94 ± 3,24	10,23 ± 5,38
48	12,21 ± 6,18 <sup>ab</sup>	10,23 ± 4,08	11,79 ± 4,99	12,98 ± 11,08

Letras minúsculas – comparação entre tempos, dentro do mesmo grupo e tratamento, na mesma coluna.  
 Letras maiúsculas – comparação entre tratamentos, dentro do mesmo grupo e tempo, na mesma linha.  
 Grupo I - Baixa atividade de FLA<sub>2</sub> (< 6,70 U/mL) e o grupo II alta atividade de FLA<sub>2</sub> (> 11,00 U/mL), no plasma seminal. (p < 0,05)

## DISCUSSÃO

### 1. Efeito do tempo de conservação

Em ambas as fases experimentais, foi observada diminuição da qualidade seminal à medida que aumentou o período de conservação do sêmen resfriado, indicando o efeito do tempo de armazenamento sobre os parâmetros avaliados. Estes dados corroboram com os encontrados anteriormente por Figueirêdo *et al.* (2002); Campos (2003); Campos *et al.* (2003b); Campos *et al.* (2004) e Islam *et al.* (2005), que também observaram uma diminuição da qualidade seminal à medida que o tempo de conservação se prolongou. Alguns estudos têm relatado que a sobrevivência espermática *in vitro* é menor, quanto maior for o tempo de preservação do sêmen, com conseqüente queda na taxa de fertilidade *in vivo* (LEBOUF *et al.*, 2003). Em carneiros, a taxa de fertilidade do sêmen resfriado diminuiu na ordem de 10 a 35% por dia de conservação (SALAMON e MAXWELL, 2000). O declínio da qualidade espermática durante sua conservação, provavelmente deve-se à atividade metabólica dos gametas, com conseqüente redução dos nutrientes disponíveis e acúmulo de substâncias tóxicas, como o ácido láctico (VISHWANATH e SHANNON, 2000; ISLAM *et al.*, 2005), além da exposição das células espermáticas aos produtos da decomposição dos espermatozóides mortos, tendo em vista a ausência de mecanismos de eliminação dessas células e seus produtos (CORTEEL, 1980).

### 2. Efeito do tratamento

Os resultados deste experimento mostraram que independente do nível de atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal de caprinos, a lavagem do sêmen melhorou os parâmetros avaliados, o que foi mais evidente no grupo I, principalmente para o vigor espermático e a TDM (Tabela 1 e 2).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com aqueles de Campos *et al.* (2004) onde a lavagem do ejaculado foi benéfica para a qualidade espermática do sêmen resfriado de caprinos da raça Saanen. A presença do plasma seminal foi um fator negativo na conservação do sêmen caprino, sugerindo que alguns componentes do plasma seminal podem ter interagido com os constituintes do diluidor, possivelmente a

gema do ovo, exercendo ação tóxica sobre os espermatozóides, interferindo assim sobre a sobrevivência espermática (CORTEEL, 1975; CAMPOS *et al.*, 2004). A retirada do plasma seminal, por lavagem do sêmen, logo após a coleta do ejaculado, seguida de diluição em meio à base de leite desnatado, aumenta significativamente a sobrevivência dos espermatozóides congelados e descongelados e incubados a 37 °C por 120 minutos (CORTEEL, 1974, CORTEEL, 1975). Em caprinos, o uso de leite desnatado como diluidor do sêmen requer a prévia remoção do plasma seminal porque este é deletério à sobrevivência espermática (SIAS *et al.*, 2005).

Yamashiro *et al.* (2006), tentando diminuir o efeito do PS sobre os espermatozóides de caprinos, coletaram o ejaculado em tubos já contendo diluidor e observaram uma melhora significativa sobre a motilidade espermática e integridade acrossômica. Sugerindo que as características funcionais *in vitro* são abruptamente modificadas pelo contato rápido com o fluido das glândulas acessórias na ejaculação.

Contudo, Roca *et al.* (1997) encontraram resultados controversos nas condições climáticas da Espanha, onde a lavagem do sêmen influenciou o vigor ou motilidade espermática.

Tendo em vista que, a lavagem do sêmen promoveu um efeito mais evidente no grupo I, de menor atividade enzimática, em detrimento do grupo II, com maior atividade de FLA<sub>2</sub>, sugere-se que em região de clima tropical a FLA<sub>2</sub> pode não ser o principal fator responsável pela baixa qualidade seminal, como acontece em regiões de clima temperado (ROY, 1957; NUNES 1982; PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997).

### **3. Efeito do grupo**

Não foi observada diferença significativa entre os grupos, a não ser para a motilidade do sêmen lavado, em T48 e do sêmen não lavado, em T24. Estes resultados sugerem que a atividade da FLA<sub>2</sub> no plasma seminal de caprinos criados em região de clima tropical são insuficientes para provocar efeito deletério sobre os espermatozóides. Sias *et al.* (2005) utilizando a mesma metodologia de determinação da atividade da FLA<sub>2</sub> no sêmen de caprinos criados em região de clima temperado, observou que a média de atividade desta enzima variou de 15 a 70 U/mL ao longo de 1 ano experimental, sendo que a máxima atividade encontrada foi de 90 U/mL. No presente

estudo, a variação média encontrada foi de 6,33 a 12,30 U/mL (mínimo de 4,50 e máximo de 19,28 U/mL), durante os meses de março e abril, demonstrando que a atividade desta enzima, no Nordeste do Brasil, está abaixo do mínimo registrado em clima temperado. Desta forma, sugere-se que outros componentes bioquímicos, que não a FLA<sub>2</sub> tem um efeito mais pronunciado sobre os parâmetros de vigor e motilidade.

A variação da concentração de certos componentes do plasma seminal, provavelmente proteínas, pode ser responsável pelos diferentes efeitos da presença do plasma seminal sobre a capacidade fertilizante dos espermatozóides (MAXWELL & JOHNSON, 1999). Pesquisas têm demonstrado que as proteínas exercem múltiplos efeitos sobre a função espermática, desempenhando um importante papel na capacitação dos espermatozóides (DESNOYERS & MANJUNATH, 1992; BARRIOS *et al.*, 2000). Em touros da raça Holandesa, de fertilidade comprovada, foi descrito vários grupos de proteínas presentes nos fluídos das glândulas anexas, sendo as mesmas responsáveis por diferentes papéis na qualidade espermática (MOURA *et al.*, 2007). Estes mesmos autores citaram que estas proteínas estão envolvidas com os processos de capacitação espermática, proteção da membrana do espermatozóide, reação acrossômica e interação com a membrana do ovócito e motilidade espermática.

Além disso, sugere-se a existência de um modulador da atividade da FLA<sub>2</sub>, cuja expressão varia entre as épocas do ano e que deve estar ausente (ou diminuída) na época não reprodutiva dos caprinos criados nas regiões subtropicais (La FALCI *et al.*, 2002). Dando suporte a essa idéia, Upreti *et al.* (1999) identificaram em sêmen de carneiro uma proteína de alto peso molecular (105 a 175 KDa) com capacidade de inibir a atividade da FLA<sub>2</sub>.

As proteínas tipo BSP (bovine seminal plasma proteins), cujas proteínas similares são encontradas no plasma seminal de vários animais (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002; VILLEMURE *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2007), incluindo o caprino no qual representa 50% das proteínas seminais (VILLEMURE *et al.*, 2003), pode exercer efeitos deletérios, quando em grandes concentrações ou quando expostos por períodos prolongados no sêmen, devido à retirada do colesterol da membrana plasmática, desestabilizando-a (MANJUNATH *et al.*, 2002). Já em concentrações adequadas, as proteínas tipo BSP ligam-se aos fosfolipídios da gema de ovo (MANJUNATH *et al.*, 2002), utilizada em diluidores de sêmen, competindo pelo sitio de ação da FLA<sub>2</sub> e dessa forma, impedindo sua ação (MANJUNATH *et al.*, 1994).

## **CONCLUSÃO**

O nível de atividade de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal de caprinos criados em região de latitude equatorial não foi o principal fator determinante da qualidade do sêmen de caprinos, não podendo ser utilizado como indicativo de qualidade espermática, na seleção de reprodutores da espécie caprina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W. U; FIGUEIRÊDO, 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, resfriado e armazenado a 4 °C. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n 3, p. 178-182, 2004.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª ed. Belo Horizonte/MG, p. 6-49, 1998.

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

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

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

CORTEEL, J.M. Production du sperme chez le bouc: variation saisonnière de la quantité et de la qualité du sperm récolte selon l'âge des animaux. **Journée Recherche Ovine et Caprine**, v. 1, p. 4-17, 1975.

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

De HAAS, G.H.; POSTEMA, N.M. NEIUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L. Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 159, n 1, p. 103-17, 1968.

DESMOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10149-11155, 1992.

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.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; CAMPOS, A.C.N.; MONTEIRO, A.W. U; SILVA FILHO, A.H.S. Viabilidade *in vitro* do sêmen caprino Saanen diluído em água de coco e resfriado a 4 °C. **Ciênc. Vet. Tróp.**, Recife-PE, v. 5, n. 1, p. 31-38, 2002.

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

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

La FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRÍGUEZ, J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of gota seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1035 – 1048, 2002.

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

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250-1258. 2002

MANJUNATH, P.; SOUBEYRAND, S.; CHANDONNET, L.; ROBERTS, K.D. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochemical Journal**, v. 303, p. 121-128, 1994.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, P. 109-119, 2002.

MARKUS, R.P.; AFECHE, S.C.; BARBOSA Jr., E.M.; LOTUFO, C.M.C.; FERREIRA, Z.S.; CIPOLLA-NETO, J. Disponível em: **Glândula Pineal e Melatonina**, 2002. <<http://www.crono.icb.usp.br/glandpineal.htm>>. Acesso em: 31/01/2008.

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

MOURA, A.A.; CHAPMAN, A.; KOC, H.; KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p.169-188, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirement of domestic animals: nutrient requirement of goats**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1981. 91p.

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

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 2 p. 109-112, 1998.

PELLICER-RUBIO, M.T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y.; Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulb urethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1023-1031, 1997.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Ruminant Research**, v. 225, p. 147 – 153, 1997.

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

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

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

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

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

UPRETI, G.C.; HALL, E.L.; KOPPENS, D.; OLIVER, J.E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and PLA<sub>2</sub> inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 107-121, 1999.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALMEIDA, A.K, PORTELA, A.P.M.; BITTENCOURT, R.F.; ALVES, S.G.G.; BITTENCOURT, T.C. C.; QUINTELA, A.T. 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**, v. 7, n. 1, p. 67-76, jan/mar, 2006

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

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

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

## **CAPÍTULO 4**

**Efeito do nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal caprino sobre a viabilidade de espermatozóides epididimários conservados a 4 °C**

**(Effect of the Phospholipase A<sub>2</sub> activity level of the seminal plasma of the buck on the epididymal spermatozoa viability cooling at 4 °C)**

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ausência ou adição de plasma seminal (PS) caprino com diferentes níveis de atividade de FLA<sub>2</sub> sobre o desempenho de espermatozóides epididimários diluídos em água de coco – 2,5% gema de ovo e resfriados a 4 °C por 48 horas. Oito bodes foram divididos em dois grupos: grupo I com baixa atividade de FLA<sub>2</sub> (< 2 U/mL) e grupo II caracterizado por alta atividade de FLA<sub>2</sub> no PS (> 3,6 U /mL). Outros seis bodes foram submetidos à castração cirúrgica para obtenção do “pool” de espermatozóides epididimários. O sêmen dos caprinos foi coletado semanalmente (6 semanas) em vagina artificial e centrifugado para recuperação do PS. O “pool” de espermatozóides epididimários foi fracionado em nove alíquotas, na qual, uma destas foi adicionada apenas de diluidor (grupo controle) enquanto as demais receberam PS de cada um dos animais dos grupos I e II. Em seguida procedeu-se a diluição final em todas as amostras ( $200 \times 10^6$  spz/mL) utilizando-se o mesmo diluidor. O sêmen diluído foi resfriado a 4 °C, conservado por 48 horas e avaliado para vigor e motilidade antes do resfriamento (T0) e às 2, 12, 24 e 48 horas de conservação (T2, T12, T24 e T48), pelo teste de termorresistência lento (TTR). A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final do TTR. Esfregaços do sêmen diluído foram confeccionados durante o TTR e 200 células foram avaliadas e classificadas como morfológicamente normais ou anormais. A adição do plasma seminal interferiu negativamente sobre o vigor, a motilidade e a TDM, principalmente quando o plasma seminal adicionado foi do grupo II. Contudo, a adição do plasma seminal reduziu a incidência das alterações morfológicas totais. Dessa forma pode-se concluir que a adição de plasma seminal caprino aos espermatozóides epididimários promoveu efeito deletério à qualidade espermática e esta influência foi mais pronunciada no grupo II. Os dados demonstram também que os espermatozóides epididimários conservados sem PS mantiveram a qualidade espermática ao longo de 48 horas de conservação.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate if the presence or absence of seminal plasma (SP) with different phospholipase A<sub>2</sub> activity level on the quality of the epididymal spermatozoa diluted in coconut water with 2.5% egg yolk. Eight bucks were separated in to groups according if the PLA<sub>2</sub> activity level: group I (< 6,7U/mL) e group II (> 11,0/mL). Others six bucks underwent a surgical castration to obtain a pool of epididymal spermatozoa. The ejaculate was collected weekly in artificial vagina and centrifuged to separation of the SP. The pool of epididymal spermatozoa was divided in nine aliquots: one was added only to diluent (control group), while others received the SP of each buck of the groups I and II. Following, the reconstituted semen samples were diluted at  $200 \times 10^6$  sperm/mL and stored at 4 °C for 48 hours. An aliquot was incubated at 38 °C and evaluated to vigor and motility at 0, 2, 12, 24 and 48 hours of cooling by thermoresistance test (TRT). The motility degradation rate (MDR) was calculated after the TRT. Slides of sperm were made during TRT and 200 cells were classified as normal or abnormal morphology. The addition of the SP influenced negatively the vigor, motility and MDR, mainly when the SP added was of the Group II. However, the addition of the SP reduced the percentage of the abnormal spermatozoa. In conclusion, the addition of the SP on epididymal spermatozoa showed a negative effect and this influence was higher in group II. The data showed also that the epididymal spermatozoa stored without SP remained the sperm quality during 48 hours.

## INTRODUÇÃO

Na última década vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de aprimorar biotécnicas da reprodução, tais como a fertilização *in vitro* e a transferência de embriões. O uso destas biotecnologias envolve animais geneticamente superiores e neste sentido, a recuperação e a conservação de espermatozóides epididimários é um procedimento que permite a utilização de reprodutores de alto valor genético quando estes sofrem alguma injúria que lhe provocam infertilidade, tal como a obstrução das vias espermáticas ou mesmo após sua morte (PATRIZIO, 2000; BLASH *et al.*, 2000). Para o sucesso destas técnicas é imprescindível o conhecimento dos fatores envolvidos na conservação dos espermatozóides epididimários, bem como os mecanismos que influenciam sua capacidade fertilizante. Desta forma, muito já tem sido investigado sobre a composição bioquímica do plasma seminal e seus efeitos sobre as células espermáticas (MANN, 1946; GONZALES *et al.*, 1984; ROCA *et al.*, 1993; HENAULT *et al.*, 1995; AURICH *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2003; YAMASHIRO *et al.*, 2006) e apesar de muitos avanços, os conhecimentos ainda são controversos e bastante limitados. Em touros da raça holandesa, foi relatado que a adição de plasma seminal aos espermatozóides epididimários aumentou a capacidade dos mesmos em penetrar a membrana dos ovócitos, quando comparado com as células espermáticas sem contato com o fluido das glândulas anexas, demonstrando que fatores específicos presentes no plasma seminal afetam a fertilidade dos espermatozóides coletados da cauda do epidídimo. (HENAULT *et al.*, 1995)

Neste sentido, realizou-se este trabalho com objetivo de avaliar o efeito da ausência do plasma seminal de machos caprinos SPRD criados em região tropical, bem como a influência da adição de plasma seminal com baixa (< 6,7 U/mL) ou alta (> 11,0 U/mL) atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) sobre o desempenho qualitativo (vigor e motilidade espermáticas, taxa de degradação da motilidade e percentual de células espermáticas com morfologia normal) dos espermatozóides epididimários diluídos em água de coco – 2,5% gema de ovo e resfriados a 4 °C por 48 horas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Local do Experimento e condições de ambiente

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, localizado à latitude sul de 3°45', longitude oeste de 38°32' e altura de 15,5m acima do nível do mar. O clima da cidade, de acordo com a classificação de Koppen, é AW, com clima quente e úmido. O período experimental transcorreu nos meses de janeiro e fevereiro de 2007, apresentando neste período temperatura média de 28,4 °C com amplitude de 25,5 a 31,0 °C, umidade relativa do ar de 73% e precipitação média de 65,25mm.

### 2. Animais Experimentais

De um total de 20 machos caprinos sem padrão racial definido (SPRD) com idade média de 30 meses, peso vivo médio de 45 Kg e circunferência escrotal média de 24 cm, oito animais foram selecionados com base no nível de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal e divididos em dois grupos: o grupo I (n = 5) foi composto por bodes cujo sêmen foi caracterizado pela baixa atividade de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (< 6,7 U/mL) e os animais do grupo II (n = 3) apresentaram alta atividade de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (> 11,0 U/mL). Do grupo remanescente, seis animais foram submetidos à castração cirúrgica e utilizados como doadores de espermatozóides epididimários. Todos os animais foram manejados em baias individuais, sob condições intensivas, alimentados com feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylum*) e 500 g concentrado energético adicionado de sal mineral (NRC, 1981) divididas em duas ofertas diárias e a água foi fornecida a vontade.

### 3. Coleta do Sêmen

O sêmen dos caprinos dos grupos I e II foi coletado semanalmente em vagina artificial, perfazendo um total de 6 ejaculados por animal. Após a coleta, o sêmen foi

centrifugado a 550 g/20 minutos em 4° C e o plasma seminal (sobrenadante) foi obtido para reconstituição do sêmen com os espermatozóides epididimários.

#### **4. Castração e Coleta dos Espermatozóides Epididimários**

Após a castração cirúrgica, os pares de epidídimo foram dissecados e separados dos testículos. Para obtenção dos espermatozóides epididimários utilizou-se o método de lavagem retrógrada (LASLEY & BORGAT, 1944; DOTT *et al.*, 1979; MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2006) que se consistiu em injetar solução fisiológica na porção inicial do ducto deferente, seguida de pequenos cortes transversais na borda ventral da cauda do epidídimo para coleta das células espermáticas. Realizou-se uma interrupção na junção corpo e cauda epididimária por uso de pinça hemostática, a fim de evitar possíveis refluxos de fluido para o corpo do mesmo.

Após a coleta, foi realizado um “pool” dos espermatozóides dos epidídimos direito e esquerdo e centrifugação deste material a 550 g/20 minutos a 4° C, com a finalidade de remoção da solução fisiológica e fluido epididimário.

#### **5. Reconstituição e Diluição do Sêmen**

Do “pool” de espermatozóides epididimários foram separadas nove alíquotas de 200µL e em uma destas, foi adicionado 250µL diluidor a base de água de coco – 2,5% de gema (grupo controle) enquanto as demais amostras receberam o mesmo volume (250µL) de plasma seminal de cada um dos oito animais experimentais, de forma que o sêmen reconstituído teve a proporção aproximada de 45% de espermatozóides epididimários e 55% de plasma seminal ou diluidor, no caso do grupo controle (LIMA *et al.*, 2006). A concentração do sêmen reconstituído foi determinada em câmara de Neubauer (CHEMINEAU *et al.*, 1991) e em seguida procedeu-se com a diluição final em todas as alíquotas à concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozóides/mL, com o mesmo diluidor. Esta solução à base de água de coco foi preparada com 50% de água de coco *in natura* e 50% de citrato a 2,5%, com objetivo de manter a solução em pH entre 6,2 e 6,8 e osmolaridade de 300mOsm. Desta solução estoque, retirou-se 2,5% do volume para o acréscimo de igual volume de gema de ovo (NUNES, 1998).

## 6. Resfriamento e avaliação do sêmen

Uma amostra de cada uma das alíquotas de sêmen reconstituído foi incubada em banho-maria para realização do teste de termorresistência lento (TTR - CBRA, 1998), que constituiu o tempo 0 (T0 – antes do resfriamento), o restante das alíquotas foram resfriadas a 4 °C por 48h e o TTR repetido às 2, 12, 24 e 48 horas (T2, T12, T24 e T48) de conservação do sêmen. Para proceder com o TTR, uma amostra de 250µl de sêmen foi levada ao banho-maria a 38 °C e uma gota do sêmen foi então posta sobre lâmina e coberta com lamínula, e levada ao microscópio ótico para avaliação dos parâmetros seminais aos 5, 60 e 120 minutos de incubação. A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final do TTR, utilizando a seguinte fórmula:

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

Esfregaços do sêmen diluído foram confeccionados aos 5 e 120 minutos durante o TTR, para todos os tempos de avaliação, perfazendo um total de 10 esfregaços por animal/coleta. Os esfregaços foram corados com azul de bromofenol (MEDEIROS, *et al.*, 2006) e, em seguida, 200 células foram avaliadas em microscopia ótica, em aumento de 1000x e classificadas como morfolologicamente normais ou com presença de anomalias espermáticas, as quais incluem: defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal e defeitos de flagelo (COLAS, 1980). As alterações morfológicas totais (AMT) são os resultados do somatório de todas as alterações da morfologia encontradas nos espermatozóides.

## 7. Análises estatísticas

Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS<sup>®</sup>, versão 8.0. Os parâmetros seminais (vigor, motilidade e TDM) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para testar os efeitos de tempo e grupo (alta ou baixa atividade de FLA<sub>2</sub> no PS). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). As variáveis motilidade e TDM sofreram transformação angular para atender à condição de normalidade.

## RESULTADOS

Os valores médios e desvio padrão de vigor, motilidade e TDM para os grupos controle, I e II, por tempo de conservação podem ser observados na tabela 1, enquanto as alterações morfológicas totais (AMT) podem ser observadas na tabela 2.

Quando os espermatozoides epididimários foram conservados por até 48 horas verificou-se uma diminuição significativa do vigor e da motilidade espermática, principalmente quando o plasma seminal foi adicionado, independente do grupo estudado.

Maiores quantidades de alterações morfológicas totais foram encontradas no grupo controle enquanto os grupos I e II foram similares para este parâmetro.

**Tabela 1** – Efeito do nível de atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal caprino em espermatozoides epididimários, diluído em água de coco – 2,5% gema e resfriado a 4° C por 48 horas sobre os parâmetros seminais de vigor, motilidade espermática e taxa de degradação da motilidade (TDM).

Tempo (horas)	Vigor			Motilidade			TDM		
	Controle	Grupo I	Grupo II	Controle	Grupo I	Grupo II	Controle	Grupo I	Grupo II
0	2,66 ± 0,38 <sup>A</sup>	2,63 ± 0,34 <sup>aA</sup>	2,25 ± 0,49 <sup>aB</sup>	66,11 ± 6,80 <sup>a</sup>	64,11 ± 6,09 <sup>a</sup>	53,89 ± 14,55 <sup>a</sup>	22,14 ± 10,11 <sup>A</sup>	29,66 ± 15,50 <sup>A</sup>	65,87 ± 34,67 <sup>B</sup>
2	2,74 ± 0,47 <sup>A</sup>	2,55 ± 0,30 <sup>abA</sup>	2,04 ± 0,54 <sup>abB</sup>	66,11 ± 6,80 <sup>aA</sup>	62,22 ± 6,74 <sup>abA</sup>	49,17 ± 13,86 <sup>abB</sup>	25,47 ± 17,66 <sup>A</sup>	27,51 ± 13,51 <sup>A</sup>	74,72 ± 31,84 <sup>B</sup>
12	2,75 ± 0,31 <sup>A</sup>	2,37 ± 0,28 <sup>bcA</sup>	1,63 ± 0,65 <sup>bbB</sup>	65,00 ± 6,23 <sup>aA</sup>	57,38 ± 7,30 <sup>bcA</sup>	38,89 ± 20,75 <sup>bbB</sup>	16,03 ± 9,31 <sup>A</sup>	30,50 ± 19,91 <sup>A</sup>	73,61 ± 35,09 <sup>B</sup>
24	2,63 ± 0,27 <sup>A</sup>	2,13 ± 0,35 <sup>cB</sup>	1,17 ± 0,88 <sup>cC</sup>	60,27 ± 6,18 <sup>aA</sup>	52,33 ± 9,85 <sup>cA</sup>	28,89 ± 21,99 <sup>cB</sup>	15,00 ± 7,52 <sup>A</sup>	30,83 ± 20,66 <sup>A</sup>	71,00 ± 32,85 <sup>B</sup>
48	2,52 ± 0,36 <sup>A</sup>	1,84 ± 0,58 <sup>dB</sup>	0,78 ± 0,92 <sup>dC</sup>	47,22 ± 20,88 <sup>baA</sup>	44,17 ± 12,46 <sup>daA</sup>	14,72 ± 20,86 <sup>dbB</sup>	6,27 ± 9,80 <sup>A</sup>	40,46 ± 29,17 <sup>B</sup>	62,22 ± 39,70 <sup>C</sup>

Grupos: controle – ausência de plasma seminal; grupo I – baixa atividade de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (6,7 < U/ mL); e grupo II – alta atividade de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (> 11,0 U/mL);

Letras maiúsculas – comparação entre grupos, dentro da mesma linha;

Letras minúsculas – comparação entre tempos, dentro da mesma coluna; (p < 0,05).

**Tabela 2** - Efeito do nível de atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal caprino em espermatozoides epididimários, diluído em água de coco – 2,5% gema e resfriado a 4° c por 48 horas sobre as alterações morfológicas totais (%).

Tempo (h)	Alterações Morfológicas Totais (%)		
	Controle	Grupo I	Grupo II
0	35,00 ± 20,95 <sup>A</sup>	27,62 ± 10,64 <sup>B</sup>	29,65 ± 9,45 <sup>B</sup>
2	32,33 ± 11,15 <sup>A</sup>	30,69 ± 12,30 <sup>B</sup>	29,89 ± 10,86 <sup>C</sup>
12	36,92 ± 13,46 <sup>A</sup>	31,17 ± 12,58 <sup>B</sup>	32,10 ± 10,48 <sup>B</sup>
24	37,92 ± 11,79 <sup>A</sup>	33,10 ± 11,89 <sup>B</sup>	28,97 ± 12,76 <sup>B</sup>
48	39,96 ± 17,9 <sup>A</sup>	32,48 ± 10,91 <sup>B</sup>	33,49 ± 11,50 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas – comparação entre tratamentos, dentro do mesmo grupo e tempo, na mesma linha. Grupos: controle – ausência de plasma seminal; grupo I – baixa atividade de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (6,7 < U/ mL); e grupo II – alta atividade de FLA<sub>2</sub> no plasma seminal (> 11,0 U/mL);

## DISCUSSÃO

Os espermatozóides da cauda do epidídimo constituem um excelente modelo experimental para testar os efeitos do plasma seminal sobre as células espermáticas, tendo em vista que as células armazenadas na cauda do epidídimo mostram-se maduras, capazes de fertilizar, mas ainda não entraram em contato com a secreção de nenhuma glândula acessória. Os espermatozóides epididimários encontraram-se livres da exposição dos efeitos do plasma seminal que ocorre no momento da ejaculação (WAY *et al.*, 2000).

Neste experimento, constatou-se que ocorreu diminuição da qualidade seminal e esse efeito foi mais intenso em função do tempo de resfriamento, quanto mais prolongado esse período, maiores foram os efeitos deletérios sobre os espermatozóides. Dados estes, também encontrados por outros autores para sêmen caprino resfriado (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2002; CAMPOS, 2003; CAMPOS *et al.*, 2003b; CAMPOS *et al.*, 2004; ISLAM *et al.*, 2005). Foi demonstrado que, quanto maior for tempo de armazenamento do sêmen, menor será a sobrevivência das células espermáticas *in vitro* quanto à fertilidade *in vivo* (LEBOUF *et al.*, 2003). O declínio da qualidade seminal observado durante a conservação, provavelmente deve-se à atividade metabólica dos gametas, resultando em consequente redução dos nutrientes disponíveis e acúmulo de substâncias tóxicas, tal como o ácido láctico (VISHWANATH & SHANNON, 2000; ISLAM *et al.*, 2005), além da exposição das células espermáticas aos produtos da decomposição dos espermatozóides mortos, considerando-se a ausência de mecanismos de eliminação dessas células e dos produtos do seu metabolismo (CORTEEL, 1980).

De uma forma geral, a adição do plasma seminal interferiu negativamente sobre o vigor, a motilidade e a TDM, principalmente quando o mesmo apresentava maior atividade de FLA<sub>2</sub> (grupo II). Alguns estudos demonstram que a adição do plasma seminal reduziu a duração da motilidade (BAAS *et al.*, 1983). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram o efeito deletério do plasma seminal sobre a qualidade espermática. Assim, como o grupo controle apresentou melhor qualidade seminal quando comparado com os grupos I e II (vigor, a partir de T12), sugere-se que o plasma seminal de caprinos criados em região de tropical possui componentes deletérios às células espermáticas. Como este efeito foi mais evidente no grupo II, é provável que o mesmo seja maximizado pela maior atividade da FLA<sub>2</sub>. Esta enzima catalisa a hidrólise das lecitinas presentes na gema de ovo

ou leite desnatado (componentes utilizados em diluidores de sêmen) em ácidos graxos e lisolecitinas, que é tóxico à sobrevivência dos espermatozóides (ROY, 1957).

Em região de clima temperado, o plasma seminal de caprinos exerce efeitos deletérios sobre a viabilidade espermática (CORTEEL, 1980). Dessa forma, a remoção do plasma seminal, logo após a coleta do ejaculado, aumentou a qualidade do sêmen descongelado, quando este foi incubado a 37 °C por 120 minutos (CORTEEL, 1974, CORTEEL, 1975). Além disso, o uso de leite desnatado como diluidor do sêmen caprino requer a prévia remoção do plasma seminal porque este é deletério à sobrevivência espermática (SIAS *et al.*, 2005).

Entretanto, a adição do plasma seminal não apresentou apenas efeitos indesejáveis sobre os EEp, visto que o mesmo propiciou uma diminuição na incidência das alterações morfológicas (tabela 2). Este resultado sugere que o plasma seminal exerce efeito seletivo sobre as células espermáticas, provavelmente por uma redução na incidência de gotas citoplasmáticas. Estudos têm demonstrado que a incidência dessa alteração morfológica ocorre com maior frequência entre os EEp que nos espermatozóides ejaculados (LASLEY & BOGART, 1944; WHITE & WALES, 1961). O sêmen é suspensão dos espermatozóides no plasma seminal, que é formado no momento da ejaculação (GONZÁLEZ, 2002). Acredita-se que a adição do plasma seminal aumenta o metabolismo das células espermáticas, pois estudos demonstraram que durante a ejaculação e ainda no aparelho reprodutivo masculino, os espermatozóides ejaculados já começam a utilizar a frutose como fonte de energia (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). Além disso, White & Wales (1961) sugeriram que a gota citoplasmática funciona como uma reserva lipídica que pode servir como fonte de energia para os espermatozóides, de modo que esta característica pode ter contribuído para que ocorresse uma redução da incidência de gotas citoplasmáticas após a adição do plasma seminal.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que a adição de plasma seminal caprino aos espermatozoides epididimários resfriados a 4 °C promoveu efeito deletério sobre a qualidade espermática a partir de 12 horas de conservação e esta influência foi mais pronunciada no grupo com maior atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (> 11,0 U/mL). Estes dados demonstram ainda que os espermatozoides epididimários diluídos em água de coco – 2,5% gema de ovo (sem adição de plasma seminal) e resfriados a 4 °C mantiveram a qualidade espermática ao longo de 48 horas de conservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after criopreservation. **Theriogenology**, 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**, v. 68, p. 275-280, 1983.

BLASH, S.; MALICAN, D.; GAVIN, W.; Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats **Theriogenology**, v. 54, p. 899-905, 2000.

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

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; SILVA FILHO, A.H.S.; MONTEIRO, A.W.U. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semi-árido Nordeste durante o período seco e chuvoso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 185-189, 2003.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; FIGUEIRÊDO, 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, resfriado e armazenado a 4 °C. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n 3, p. 178-182, 2004.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª ed. Belo Horizonte/MG, p. 6-49, 1998.

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

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

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

CORTEEL, J.M. Production du sperme chez le bouc: variation saisonnière de la quantité et de la qualité du sperm récolté selon l'âge des animaux. **Journée Recherche Ovine et Caprine**, v. 1, p. 4-17, 1975.

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

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

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; CAMPOS, A.C.N.; MONTEIRO, A.W.U; SILVA FILHO, A.H.S. Viabilidade *in vitro* do sêmen caprino Saanen diluído em água de coco e resfriado a 4° C. **Ciênc. Vet. Tróp.**, Recife-PE, v. 5, n. 1, p. 31-38, 2002.

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

GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Laboratório de Bioquímica Clínica Animal. Porto Alegre, 2002.

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

ISLAM, L.; AHMED, K.; DEKA, B.C. Effect of holding and washing on the quality of goat semen. **Small Ruminant Research**, v. 66, nº 1-3, p. 51-57, 2005.

LASLEY, F.J.; BOGART, R. A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. **Journal Animal Science**, v. 3, p. 360-370, 1944.

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

LIMA, I.C.S.; CATUNDA, A.G.V.; PEREIRA, J.F.; ANDRADE, I.R.A.; MONTEIRO, A.W.U.; CAMPOS, A.C.N.; ARAÚJO, A.A. Determinação do volume do ejaculado e plasma seminal de caprinos sem padrão racial definido (SPRD) durante a época seca no estado do Ceará. In: XVI Congresso Brasileiro de Zootecnia, XVI, 2006, Recife. **Anais...** Recife: Associação Brasileira de Zootecnia [2006] (CD-ROM).

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. **Biochemical Journal**, v. 40, n. 4, p. 481-491. 1946.

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

MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; ESTESO, M.C.; ANEL, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; PAZ, P.; GARDE, J.; ANEL, L. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolarity. **Theriogenology**, v. 66, no 5, p. 1165-1172, 2006.

MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; RODRIGUES, L.F.S. Utilização do Azul de Bromofenol conservado a 4 °C e 29 °C, como método coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 1, p. 287-297, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirement of domestic animals: nutrient requirement of goats**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1981. 91p.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 2 p. 109-112, 1998.

PATRIZIO, P. Cryopreservation of epididymal sperm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 11-14, 2000.

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

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

SAS, User's guide: statistics – version 8. ed. Cary, **Statistical Analysis System Institute**, 2000.

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

SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; BLOCH JUNIOR, C. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfolisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado do bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1890-1900, 2003.

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

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

WAY, A.L.; LESTER C. GRIEL JR, AND GARY J. KILLIAN. Effects of Accessory Sex Gland Fluid on Viability, Capacitation, and the Acrossome Reaction of Cauda Epididymal Bull Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, 2000.

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

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que caprinos sem padrão racial definido, quando criados em região de clima tropical, apresentam melhor qualidade espermática durante os meses chuvosos do que no período em que a precipitação é praticamente inexistente. Coincidentemente, também se verificou que as concentrações de determinados componentes do plasma seminal, como frutose, ácido cítrico, proteínas totais, P e Mg, são mais elevados na época chuvosa, enquanto que a atividade da FLA<sub>2</sub> é maior neste período. Verificou-se ainda que parâmetros seminais apresentaram correlações positivas com os níveis de frutose, ácido cítrico, proteínas totais e Mg e negativas com as concentrações de fósforo e quantificadas no plasma seminal.

Portanto, sugere-se que os caprinos podem apresentar melhor desempenho reprodutivo na época das chuvas e que esta é também o melhor período para a coleta e conservação do sêmen. Tal informação implica também que a utilização de reprodutores na época seca, deve exigir práticas diferenciadas de manejo. A manipulação de amostras de sêmen para inseminação artificial ou fertilização *in vitro* neste período do ano também exigirá o desenvolvimento de protocolos específicos para prevenir decréscimos significativos na capacidade fecundante das células espermáticas.

A presença do plasma seminal no sêmen resfriado a 4 °C teve efeito deletério sobre os espermatozoides, sendo recomendada a lavagem do sêmen para se obter uma melhor qualidade seminal. Contudo, o nível de atividade da FLA<sub>2</sub> não interferiu significativamente na qualidade dos espermatozoides ejaculados e logo não pode ser utilizado como um indicativo da qualidade seminal.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)