

LEONARDO FRANCO MARTINS

**AVALIAÇÃO DO SÊMEN E PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO PLASMA
SEMINAL DE BODES DA RAÇA PARDA ALPINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

LEONARDO FRANCO MARTINS

**AVALIAÇÃO DO SÊMEN E PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO PLASMA
SEMINAL DE BODES DA RAÇA PARDA ALPINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 22 de outubro de 2001.

Simone Eliza Facione Guimarães

Maria Cristina Bacarat Pereira

Eduardo Paulino da Costa
(Conselheiro)

Ciro Alexandre Alves Torres
(Conselheiro)

José Domingos Guimarães
(Orientador)

Às pessoas que mais amo neste mundo,
Adalberto, Maria da Conceição, Andréia, Antônio Patrício e companhia,
e minha sobrinha Manuela.

AGRADECIMENTO

À Minas Gerais por ter me ensinado um pouco sobre o jeito mineiro de ser.

A Viçosa, pelos amigos que fiz.

À CAPES, pela bolsa de estudo durante o mestrado.

Aos Departamentos de Veterinária e Zootecnia, que proporcionaram a realização deste trabalho.

A todos que trabalharam no setor de caprinocultura da UFV, Professor Marcelo, André, Ancelmo, Passarinho, Vitor, Larissa e todos os funcionários.

Ao meu orientador José Domingos Guimarães e sua esposa Simone Guimarães, por seus ensinamentos, e por serem exemplos como profissionais e pessoas.

Aos professores, Maria Cristina pela grande ajuda e confiança, Ciro Torres pelos ensinamentos, e Eduardo Paulino pelos ensinamentos e conselhos.

Ao Sr. Nenzinho, pela amizade e ajuda.

Aos estagiários Thiago e Wanderberg, pelo incentivo, pela amizade, pela seriedade e compromisso com este trabalho

À república dos amigos do Tide, aos irmãos Valiatti, à comunidade caboverdiana em Viçosa e, em especial, ao Tide e Nadja pelas aulas de excel.

Ao Moacir, Neto, Leticia, Wal, Trícia, Marilú, Juliana, Robson e todos que estiveram no laboratório de reprodução animal que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, crescimento pessoal e profissional.

BIOGRAFIA

LEONARDO FRANCO MARTINS, filho de Adalberto Martins e Maria da Conceição Franco Martins, nasceu em 24 de fevereiro de 1975, na cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Em 1998, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná.

Em agosto de 1999, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em nível de mestrado, área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal, junto ao Departamento de Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Teste hipoosmótico	4
2.2. Proteínas do plasma seminal	7
CAPÍTULO 1	14
CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO PLASMA SEMINAL E VIA- BILIDADE ESPERMÁTICA EM BODES DE RAÇA PARDA ALPI- NA AVALIADA POR MEIO DO TESTE HIPOOSMÓTICO E TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA	14
1. INTRODUÇÃO	14

	Página
2. MATERIAL E MÉTODO	16
2.1. Animais e preparo das amostras de sêmen	16
2.2. Avaliação física e morfológica do sêmen	17
2.3. Teste hipoosmótico	18
2.4. Concentração protéica do plasma seminal	19
2.4.1. Separação do plasma seminal do ejaculado	19
2.4.2. Preparo do reagente	19
2.4.3. Preparo da curva padrão e determinação da concentração pro- téica	20
2.5. Teste de termorresistência lento	21
2.6. Análise estatística	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4. CONCLUSÃO	40
CAPÍTULO 2	41
DESEMPENHO REPRODUTIVO E PERFIL PROTÉICO DC PLASMA SEMINAL E TESTE HIPOOSMÓTICO EM BODES DA RAÇA PARDA ALPINA EM REGIME DE MONTA CONTROLADA	41
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODO	43
2.1. Animais e preparo das amostras de sêmen	43
2.2. Avaliação física e morfológica do sêmen	44
2.3. Teste hipoosmótico	44
2.4. Concentração protéica do plasma seminal	44

	Página
2.5. Estação de monta e diagnóstico de gestação	44
2.6. Análise estatística	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4. CONCLUSÃO	56
3. CONCLUSÕES GERAIS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

1	Composição das soluções hipoosmótica e isoosmótica	19
2	Composição da solução utilizada no teste de termorresistência ...	22
3	Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina	25
4	Valores médios e desvios-padrão dos aspectos morfológicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina	27
5	Valores médios e desvios-padrão dos percentuais de caudas dobradas encontradas depois da incubação de sêmen caprino nas soluções isoosmótica e hipoosmótica	32
6	Valores médios, desvios-padrão e coeficiente de variação da motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático após 3 horas de incubação do sêmen de bodes da raça Parda Alpina no teste de termorresistência lento	36
7	Valores médios e desvios-padrão da concentração protéica total do plasma seminal (g/dl) do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina	37
8	Valores médios e desvios-padrão da concentração protéica total do plasma seminal (g/dl) do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina durante os dias de coleta	38

	Página
9	Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina 46
10	Valores médios e desvios-padrão dos aspectos morfológicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina 47
11	Valores médios e desvios-padrão dos percentuais de caudas dobradas encontradas depois da incubação de sêmen caprino nas soluções isoosmótica e hipoosmótica 49
12	Valores médios e desvios-padrão da concentração protéica total do plasma seminal (g/dl) de sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina 52
13	Desempenho reprodutivo de bodes da raça Parda Alpina em regime de monta controlada 54

LISTA DE FIGURAS

1	Curva padrão para determinar a concentração protéica	21
2	Valores absolutos de motilidade espermática progressiva retilínea registrados nos ejaculados de bodes adultos da raça Parda Alpina durante o período experimental	25
3	Valores absolutos dos defeitos totais apresentados por cada animal durante os dias de coleta	28
4	Temperaturas máximas e mínimas na região de Viçosa observadas durante os dias de coleta comparadas com a temperatura limite de conforto térmico	31
5	Médias obtidas nos testes isoosmótico (iso), hipoosmótico (hipo), médias percentuais de caudas dobradas encontradas na morfologia espermática (cauda) e defeitos espermáticos totais (def. totais) durante as coletas	34
6	Motilidade progressiva retilínea espermática em função do tempo durante o teste de termorresistência realizado no sêmen de bodes da raça Parda Alpina	36
7	Valores absolutos dos defeitos totais apresentados por cada animal da raça Parda Alpina durante os dias de coleta	48

8	Valores médios registrados nos testes isoosmótico (iso), hipoosmótico (hipo), médias dos percentuais de caudas dobradas encontradas na morfologia espermática (cauda) e defeitos espermáticos totais (def. totais) durante as coletas	50
9	Temperaturas máximas e mínimas na região de Viçosa, observadas durante os dias de coleta, comparadas com o limite de conforto térmico	52

RESUMO

MARTINS, Leonardo Franco, M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2001. **Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça Parda Alpina**. Orientador: José Domingos Guimarães. Conselheiros: Ciro Alexandre Alves Torres e Eduardo Paulino da Costa.

O objetivo deste trabalho foi estudar a qualidade seminal *in vitro* analisada por meio de testes complementares e sua relação com os aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de bodes da raça Parda Alpina. O 1.º experimento foi realizado durante os meses de janeiro e fevereiro de 2001 e foram utilizados quatro reprodutores adultos criados em condições intensivas. As coletas de sêmen foram realizadas empregando-se o método de vagina artificial. Em todas as coletas além do exame físico e morfológico do sêmen foi realizado o teste hiposmótico e incubação isoosmótica como grupo controle. Os bodes apresentaram diferença nos aspectos físicos e morfológicos, no teste hiposmótico e teste de termorresistência ($p < 0,05$). Os resultados dos testes de termorresistência lento tiveram correlação alta com o percentual de espermatozoides reativos ao meio hiposmótico (0,67). O 2.º experimento foi realizado durante final do mês de fevereiro até início do mês de abril de 2001 no

mesmo local. Foram realizadas as coletas de quatro reprodutores adultos que se encontravam em regime de monta controlada. Em todas as coletas além do exame físico e morfológico do sêmen foram realizados os testes hipoosmóticos, isoosmóticos e a determinação da concentração protéica total do plasma seminal. Foi detectada diferença entre os bodes na concentração protéica total do plasma seminal ($p < 0,05$), mas não foram detectadas diferenças no teste hipoosmótico e coberturas por prenhez ($p > 0,05$). De acordo com os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que o teste hipoosmótico pode ser uma importante ferramenta para a avaliação de sêmen caprino e a concentração protéica total do plasma seminal não pode ser utilizada como parâmetro para predizer a qualidade seminal de bodes da raça Parda Alpina.

ABSTRACT

MARTINS, Leonardo Franco, M.S., Universidade Federal de Viçosa, October 2001. **Evaluation of semen and soluble proteins of the seminal plasm in Brown Alpine goats.** Adviser: José Domingos Guimarães. Committee Members: Ciro Alexandre Alves Torres and Eduardo Paulino da Costa.

The objective of this work was to study the *in vitro* seminal quality analyzed by complementary tests and compare them with physical, morphologic and biochemical aspects of the semen of male goats of the Alpine Brown breed. Two experiments were accomplished in the Caprinocultura Section of UFV of the Department of Zootecnia of the Federal University of Viçosa in the city of Viçosa. The first experiment was done during the months of January and February of 2001 and four adult male goat of the Alpine Brown breed were used in intensive conditions. The semen was collected three times a week for all male goats, by artificial vagina method. Physical and morphological analysis of the semen were accomplished by test hipoosmótico and isoosmotic's incubation as control group. The male goats presented difference in the physical and morphologic aspects, in the hyposmotic test and term-resistance test ($p < 0,05$). Results of the slow term-resistance tests and hyposmotic test were highly

correlated (0,67). The second experiment was done in February and April of 2001 in the same place. Samples were collected twice a week from 4 adult male goats of the Alpine Brown breed that were in breeding season. All semen samples besides the physical and morphological analysis, the hypoosmotic test, the isoosmotic's incubation and the protein concentration of the seminal plasm were done. Difference was detected among male goats in the total protein concentration of the seminal plasm ($p < 0,05$), but differences were not detected in the hipoosmótico test ($p > 0,05$) and gestation rate ($p < 0,05$). It was concluded that the hypoosmotic test can be an important tool for the evaluation of goat semen and the protein concentration of the seminal plasm cannot be used as a parameter to predict the seminal quality of male goats of the Alpine Brown breed.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A caprinocultura brasileira apresentou grande crescimento nos últimos anos, principalmente na região Nordeste, mas ainda possui baixos índices de produtividade (MOREIRA et al., 2000). Uma das ferramentas importantes para aumentar esses índices é a utilização de machos geneticamente superiores e de fertilidade comprovada, visto que a fertilidade do rebanho está diretamente relacionada ao número de fêmeas cobertas (RIBEIRO, 1997).

A espécie caprina possui estacionalidade reprodutiva, em que as fêmeas ficam em anestro, e os machos têm sua qualidade seminal diminuída fora da estação. Os fatores responsáveis pela estacionalidade podem ser intrínsecos ou extrínsecos. Dentre os intrínsecos, destacam-se a raça, o peso e a idade; dentre os extrínsecos, fotoperíodo, latitude, temperatura, umidade e alimentação (NUNES, 1982). A atividade do sistema hipotalâmico-hipofisário em bodes é influenciada pelo fotoperíodo, em que a diminuição durante o ano aumenta os pulsos de LH (hormônio luteinizante), a concentração de andrógenos e volume testicular (RITAR, 1991). A nutrição também é uma variável importante, pois se o verão for chuvoso com disponibilidade de nutrientes nas forrageiras, há melhor qualidade seminal dentro da estação reprodutiva (NUNES, 1982).

Exames andrológicos de rotina, testes complementares e teste de comportamento sexual, associados com o desempenho reprodutivo em regime de

cobertura natural, permitem prever com maior confiabilidade o potencial reprodutivo dos machos, possibilitando ao produtor uma racionalização do uso de seus reprodutores. Diversas técnicas complementares são utilizadas para melhor avaliação da fertilidade de bodes, tais como: teste de termorresistência, teste de reação acrossômica, integridade acrossômica, penetração de espermatozoides no muco cervical, teste de adesão dos espermatozoides a zona pelúcida de ovócitos, técnicas de coloração, entre outras. Cada técnica está relacionada com diferentes aspectos da qualidade seminal e seus resultados ainda não são totalmente compreendidos.

Os espermatozoides são células complexas em que a capacidade fecundante está relacionada não só com aspectos físicos e morfológicos, mas também com aspectos bioquímicos do sêmen. A avaliação isolada de apenas um desses aspectos não é eficaz para prever a fertilidade de machos; desta forma, a utilização conjunta de técnicas de rotina e complementares para a avaliação andrológica pode ser uma importante ferramenta para avaliar os melhores animais, detectar animais subfértis e melhorar estratégias de conservação espermática.

Este estudo foi realizado com o objetivo de estudar as relações entre os aspectos físicos e morfológicos do sêmen, os testes complementares (hiposmótico e teste de termorresistência), a concentração protéica total do plasma seminal e o desempenho reprodutivo de bodes da raça Parda Alpina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os espermatozoides, enquanto localizados nos testículos, são funcionalmente imaturos, sendo inférteis e imóveis. Adquirem a capacidade de fecundar nos epidídimos, que possuem as funções de transportar, armazenar e promover a maturação dos espermatozoides. Durante a maturação espermática nos epidídimos, ocorrem alterações bioquímicas nas membranas plasmáticas, como a alteração de ácidos graxos saturados para insaturados e a perda de proteínas com cargas positivas, revertendo sua polaridade durante o trânsito epididimário (SUNDHEY et al., 1995). Alterações na membrana plasmática dos espermatozoides ocorrem, quando estes entram em contato com o líquido seminal, e durante a migração espermática pelo trato genital feminino. Moléculas adsorvidas pela membrana plasmática, durante a maturação epididimária e ejaculação, estão sujeitas à resistência mecânica e interações eletroquímicas oferecidas por componentes do muco cervical e uterino, possibilitando a capacitação espermática e fecundação do ovócito no trato genital feminino (HAFEZ, 1995).

Segundo YANAGINACHI (1994), o aumento da permeabilidade da membrana a íons desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos, que culminam na hiperativação do flagelo e reação acrossômica. Este evento é pré-requisito para a fecundação, e a reação do acrossoma é considerada como etapa

final da capacitação espermática (FRASER e AJULIA, 1988). É possível que a capacitação espermática esteja mais envolvida com a remoção de fatores decapacitantes do que a ativação do processo com um estímulo, pois, a diluição de espermatozoides de mamíferos com solução fisiológica e outras soluções isotônicas remove proteínas adsorvidas na membrana plasmática dos espermatozoides, antioxidantes naturais e outras substâncias com função de proteção da integridade da membrana dos espermatozoides (MAXWELL e JOHNSON, 1999).

Esses fatores decapacitantes são polipeptídeos originados das secreções dos epidídimos e glândulas anexas, e ligam-se aos espermatozoides no momento da ejaculação (YANAGINACHI, 1994). A mudança da permeabilidade da membrana ao cálcio e subsequente aumento de AMPc (adenosina monofosfato cíclica), pH intracelular, e fosforilação da proteína tirosina são essenciais à capacitação espermática (PARRISH et al., 1994; UGUZ et al., 1994; VISCONTI e KOPF, 1998). PARRISH et al. (1999) relataram que, durante a capacitação, ocorre aumento intracelular de Ca^{++} e armazenamento do mesmo no acrossoma (para liberação durante a reação do acrossoma). Todas essas funções na capacitação espermática, principalmente a permeabilidade seletiva a íons, demonstram a importância da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides.

2.1. Teste hipoosmótico

O processo de capacitação, reação do acrossoma e fertilização necessita de uma membrana bioquimicamente ativa (YANAGINACHI, 1994), e usualmente utilizam-se os testes supravital e hipoosmótico para avaliar a integridade da membrana espermática. Diferentes aspectos da membrana plasmática dos espermatozoides são avaliados em cada teste. A coloração supravital determina se a membrana está fisicamente danificada (um sinal de morte celular), e o teste hipoosmótico avalia a atividade bioquímica da

membrana intacta devido ao influxo de água para o interior das células (CORREA e ZAVOS, 1994).

Uma importante propriedade das membranas plasmáticas celulares é a habilidade de permitir o transporte seletivo de moléculas, em diferentes gradientes de concentração de um soluto. A membrana plasmática possui moléculas protéicas que fazem esta função, que são os canais iônicos e outras proteínas específicas (ALBERTS et al., 1997). O teste em solução hipoosmótica consiste no aumento de volume celular dos espermatozóides expostos a uma solução hipoosmótica, associada a uma expansão da membrana plasmática e conseqüente alteração das estruturas utilizadas para a movimentação dos espermatozóides, forçando o flagelo a curvar-se em espermatozóides com a membrana intacta, e os espermatozóides com danos na membrana plasmática permanecem aparentemente normais em microscopia óptica (DREVIUS, 1972). A membrana plasmática da região da cauda dos espermatozóides parece mais susceptível à incubação hipoosmótica, ocorrendo edema da região com flexão dos filamentos axiais do axonema, visto a íntima relação entre a membrana plasmática e os filamentos axiais (JEYENDRAN et al., 1984).

JEYENDRAN et al. (1984), trabalhando com sêmen humano, desenvolveram o teste hipoosmótico, usando uma concentração de 150mOsm/Kg de frutose em solução de citrato de sódio, com correlação muito alta (0,94) com o teste de penetração de ovócitos desnudados de hamsters. Correlações altas entre o teste hipoosmótico e a fertilidade de amostras de sêmen bovino congeladas foram verificadas em programas de inseminação artificial (REVELL e MRODE, 1994; CORREA et al., 1997). Entretanto, ROTA et al. (1999) observaram correlações baixas e negativas entre o teste hipoosmótico em sêmen congelado bovino e posterior registros de fertilidade *in vitro*.

O teste hipoosmótico é um teste simples, barato, e prontamente aplicável juntamente com os exames de rotina utilizados para avaliar a fertilidade de touros e os danos em membrana dos espermatozóides, ocasionados pelos processos de criopreservação (CORREA e ZAVOS, 1994). De acordo com VAZQUEZ et al. (1997), o teste hipoosmótico utilizado em conjunto com outros testes de

integridade de membrana é uma importante ferramenta para a detecção de espermatozoides com alterações na membrana plasmática, em espermatozoides suínos, visto que alguns são considerados com a membrana íntegra na coloração supravital e não mantêm a atividade bioquímica da membrana plasmática ao ser incubados em solução hipoosmótica. Recentemente, NAGY et al. (1999) ao estudarem o teste hipoosmótico e a coloração supravital, desenvolveram uma técnica em câmara úmida que combinou os dois testes em sêmen bovino, ovino e suíno. Os autores confirmaram que a coloração supravital pode ser falha na detecção de danos à membrana plasmática na região da cauda. Os testes de coloração são usualmente realizados para analisar a morfologia de cabeça, enquanto as preparações em câmara úmida são preferencialmente utilizadas para analisar a morfologia de peça intermediária e cauda (BARTH e OKO, 1989). NAGY et al. (1999) encontraram coeficientes de correlação da percentagem de caudas coradas, no teste supravital, e caudas dobradas no teste hipoosmótico de 0,81, 0,94 e 0,85 para bovinos, ovinos e suínos, respectivamente, e reafirmaram a necessidade do uso, em conjunto, das diferentes técnicas para avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.

As diferenças entre as espécies na composição da membrana plasmática e metabolismo espermático podem determinar diferentes comportamentos frente ao meio hipoosmótico. A presença de frutose no meio hipoosmótico não altera a morfologia da cauda dos espermatozoides eqüinos (CAIZA et al., 1997), enquanto a morfologia da cauda de espermatozoides caninos incubados em solução hipoosmótica é influenciada pela presença de frutose (RODRIGUEZ-GIL et al., 1994). A frutose é encontrada em baixas concentrações no sêmen de cães e garanhões (HAFEZ, 1995), mas, mesmo assim, é utilizada nos testes realizados em sêmen de cães devido aos melhores resultados encontrados (RODRIGUEZ-GIL et al., 1994). Espermatozoides de eqüinos reagem em soluções hipoosmóticas de citrato de sódio, cujos os resultados relacionaram-se com a viabilidade, motilidade progressiva, alterações acrossômicas (CAIZA et al., 1997), e outros testes de avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (NEILD et al., 1999).

2.2. Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal é um fluido bioquimicamente complexo, formado pelas secreções dos testículos, epidídimos, ductos deferentes, ampolas, glândulas vesiculares, próstata e bulbouretrais. Ele é constituído de proteínas, carboidratos, lipídeos, sais minerais, e vitaminas, e tem a função de veículo dos espermatozóides no momento da ejaculação, providenciando substratos metabolizáveis e proteção no trato genital feminino.

Os diversos estudos realizados sobre a importância do plasma seminal na fertilidade dos espermatozóides são conflitantes. A remoção das glândulas sexuais secundárias de machos hamsters não interferiu na percentagem de clivagem de embriões *in vitro* (CHEN e CHOW, 1988), mas sua ausência diminuiu a fertilidade dos espermatozóides no trato genital feminino de ratas (QUEEN et al., 1981; BETSY e OLDS-CLARKE, 1986). MAXWELL et al. (1999), testando a adição de plasma seminal de ovino congelado e descongelado, verificaram que aumentou a taxa de gestação em cabras inseminadas pelo método intracervical, mas não aumentou a taxa de gestação em ovelhas inseminadas, diretamente, nos cornos uterinos com o uso de um laparoscópio, sugerindo a importância de substâncias no plasma seminal na viabilidade espermática no trato genital feminino.

AHMAD et al. (1996), estudando a influência do plasma seminal em sêmen de búfalo, concluíram que a remoção do plasma seminal aumenta a sobrevivência dos espermatozóides em diluente incubado em banho-maria a 37°C, em consequência da remoção de moléculas de alto peso molecular por meio de centrifugação. As moléculas de alto peso molecular são responsáveis pelo efeito danoso aos espermatozóides, enquanto moléculas de baixo peso molecular estão relacionadas à ativação da motilidade espermática (BAAS et al., 1983). As proteínas do plasma seminal bovino estão em agregados protéicos de alto peso molecular que, ao se depararem com a presença de citrato e condições ácidas, separam-se em moléculas protéicas de baixo peso molecular (AL SOMAI et al., 1994a e 1994b).

Adicionalmente KATSKA et al. (1996), pesquisando a influência do plasma seminal na fertilidade *in vitro* de espermatozóides bovinos, concluíram que a ausência do plasma seminal durante a capacitação espermática *in vitro* é favorável para produção de embriões *in vitro*. A remoção de substâncias presentes na membrana plasmática dos espermatozóides apresentou aglutinações de cabeça (possivelmente início de fluidez da membrana plasmática), e a adição de plasma seminal previne esta situação (MAXWELL e JOHNSON, 1999).

A caracterização de quatro diferentes proteínas no plasma seminal de touros e sua relação com a fertilidade, em programa de inseminação artificial, demonstrou que duas dessas moléculas com peso molecular de 26kDa e 55kDa estavam relacionadas a touros de alta fertilidade, enquanto duas moléculas de 16kDa estavam relacionadas a touros de baixa fertilidade (KILLIAN et al., 1993). Outros trabalhos confirmaram que existe efeito benéfico do fluido das glândulas sexuais secundárias de touros de alta fertilidade (comparado com o de touros de baixa fertilidade), em espermatozóides epididimários, utilizando o método de adesão à zona pelúcida em oócitos bovinos (HENAULT et al., 1995). Em garanhões, alguns trabalhos demonstraram que a análise do perfil protéico pode ser um indicador da capacidade reprodutiva de machos (BRANDON et al., 1999), e a idade influencia concentração protéica total do plasma seminal (AHMED et al., 1993).

Os epidídimos são responsáveis por evitar a peroxidação dos lipídeos das membranas plasmáticas dos espermatozóides, durante o armazenamento e maturação espermática, visto que as membranas plasmáticas dos espermatozóides são ricas em ácidos graxos poliinsaturados. Para que isso não ocorra, os epidídimos secretam proteínas e enzimas com ação antioxidante (HINTON et al., 1995).

As proteínas são caracterizadas quanto ao peso molecular, forma, afinidade de ligação, carga elétrica, etc. Técnicas de eletroforese são utilizadas para identificação das proteínas quanto ao seu peso molecular e ponto isoelétrico, e utilizadas em conjunto com imunofluorescência e radioimunensaio para identificar e caracterizar locais de produção no trato reprodutor masculino,

atividade biológica e importância na fertilidade dos animais. Em 1965, Shannon isolou um fator no plasma seminal de touros, provavelmente uma proteína, que diminuiria a viabilidade espermática medida por meio do teste de termorresistência. Muitos outros trabalhos identificaram moléculas protéicas e suas atividades em sêmen bovino, como proteínas secretadas pelas vesículas seminais que tem função de remoção eritrocitária e de gotas citoplasmáticas (KYSILKA, 1973) e ligadoras de cálcio, um importante elemento na ativação da capacitação espermática (LUKAC et al., 1976).

O plasma seminal bovino apresenta várias proteínas com atividade de imunossupressão de linfócitos bovinos *in vitro* (FAHMI et al., 1985a; FAHMI et al., 1985b), visto que o sêmen é potencialmente antigênico no interior do trato reprodutivo da fêmea (Hunter et al., 1964, citados por FAHMI et al., 1985a). Ainda com a função de proteger os espermatozoides no trato genital feminino, proteínas com ação antimicrobiana são secretadas pelas glândulas anexas em bovinos (SINSINTHY et al., 1984). DACHEUX et al. (1983), ao incubarem espermatozoides epididimários em solução de Ringer com bicarbonato a 37°C e diferentes concentrações dos fluidos epididimários e respectivo isolamento das proteínas, demonstraram a existência de fatores protéicos nos fluidos epididimários de carneiros e varrões que previnem a aglutinação espermática. HOWARD et al. (1978) identificaram uma proteína com baixo peso molecular secretada pelos epidídimos, que estimula a motilidade espermática em bovinos. Posteriormente, na mesma espécie, SHONECK et al. (1996) identificaram uma proteína de peso molecular de 13kDa, secretada pelas glândulas vesiculares e pelas ampolas dos ductos deferentes de bovinos, a qual suprime a motilidade espermática e protege os espermatozoides contra a peroxidação dos lipídeos durante o armazenamento nas ampolas dos ductos deferentes, demonstrando a importância da identificação e caracterização protéica.

As principais proteínas do plasma seminal de bovinos são da família das proteínas ácidas, chamadas BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3(15-16kDa) e BSP-30-kDa, secretadas pelas glândulas vesiculares e adsorvidas na membrana plasmática durante a ejaculação (MANJUNATH et al., 1993). Estas

glicoproteínas interagem com os fosfolídeos com radical colina da membrana plasmática dos espermatozóides, prevenindo as alterações dos lípidos de membrana plasmática que ocorrem durante a capacitação espermática. Acredita-se que as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e a albumina sérica bovina (substâncias presentes no momento do cio no aparelho reprodutor feminino) tenham papel na remoção do colesterol da membrana plasmática dos espermatozóides, e que a remoção deste esteróide esteja ligada à alteração da fluidez e permeabilidade da membrana durante a capacitação (CROSS, 1998).

O encontro de espermatozóides com lipoproteínas de alta densidade, no aparelho genital feminino, possivelmente forma um complexo com os fosfolídeos da membrana plasmática, colesterol, proteínas adsorvidas, e lipoproteínas de alta densidade (THERIEN et al., 1999), alterando a permeabilidade da membrana plasmática e permitindo que o íon cálcio entre e ative a fosfolipase A_2 (MANJUNATH et al., 1994), enzima importante na capacitação espermática. As fosfolipases A_2 são enzimas dependentes do íon cálcio, que atuam desestabilizando a membrana plasmática dos espermatozóides, assim aumentando a permeabilidade a íons da membrana e promovendo a capacitação espermática. Em carneiros, foi demonstrado que sua atividade no plasma seminal está relacionada a moléculas de baixo peso (13-43kDa), enquanto nos espermatozóides ela existe como um agregado de alto peso molecular aderido à membrana plasmática (105-175kDa) (UPRETI et al., 1999).

Outra função das principais proteínas do plasma seminal de bovinos (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30-kDa) é a de ligação com hormônios peptídeos, como os IGFs I e II (insulin-like growth factor I e II) (DESNOYERS e MANJUNATH, 1994). Os IGFs têm a função de regular a proliferação de vários tecidos e tipos celulares *in vitro* ou *in vivo* (COHEN et al., 1994), provavelmente estejam relacionados à proliferação de células testiculares e epididimárias (HINTON et al., 1995). A presença dos IGFs no plasma seminal e receptores nas membranas plasmáticas foi recentemente demonstrada (HENRICKS et al., 1998). Uma enzima secretada pela próstata regula a atividade deste hormônio (COHEN

et al., 1994), mas ainda não se entende qual é sua participação no metabolismo espermático (HOEFLICH et al., 1999).

Foi demonstrado que alguns glicosaminoglicanos que estão presentes no trato genital feminino, induzem a capacitação espermática. A heparina é um dos glicosaminoglicanos capazes de induzir *in vitro* a reação do acrossoma e capacitar espermatozóides no ejaculado bovino. UGUZ et al. (1994), concluíram que a heparina participa na capacitação pelo aumento do AMPc e fosforilação da proteína tirosina, mas não participa na alcalinização intracelular durante o processo de capacitação. A heparina promove a capacitação pela ligação e remoção de proteínas do plasma seminal, que estão adsorvidas pela membrana plasmática do espermatozóide e possuem a função de inibir a capacitação (THERIEN et al., 1995). A heparina liga-se a membrana plasmática dos espermatozóides por meio de proteínas ligadoras de heparina (baixo peso molecular), potencializando seus efeitos por aumentar os locais de atuação na membrana plasmática (THERIEN et al., 1997). Essas proteínas são produzidas na próstata, glândulas bulbouretrais, glândulas vesiculares seminais e ampolas, e adsorvidas na membrana plasmática no momento da ejaculação. Segundo BELLIN et al. (1996 e 1998), essas proteínas são um grande indicativo do potencial reprodutivo de touros.

A atividade enzimática no plasma seminal tem sido muito estudada devido a identificação de diversas enzimas com diversas funções biológicas. A presença de arilsulfatases em suínos, equinos, cães, coelhos e touros, altera a estabilidade e permeabilidade da membrana plasmática dos espermatozóides, e foi descrita por GADELLA et al. (1991).

MATOUSEK e KLAUDY (1998) não encontraram diferença na concentração de ribonucleases no plasma seminal de touros de alta fertilidade, comparados com os de baixa fertilidade, mas concluíram que essas enzimas são sintetizadas nas ampolas e glândulas vesiculares de bovinos. As atividades enzimáticas das transaminases (Glutamato Oxaloacetato Transaminase e Glutamato Piruvato Transaminase) no plasma seminal estão relacionadas com o grau de injúria celular dos espermatozóides, visto que em condições adversas os

espermatozóides liberam essas enzimas para o ambiente extracelular (TULI e HOLTZ, 1994; SINHA et al., 1996). Existe uma relação entre níveis altos de atividade dessas enzimas e anormalidades espermáticas, em touros (PANGAWKAR et al., 1988).

O plasma seminal caprino possui algumas particularidades, principalmente em sua composição enzimática. Enzimas secretadas pelas glândulas bulbouretrais foram identificadas e caracterizadas no plasma seminal, sendo uma lipase glicoprotéica com 55 a 60kDa, com ação deletéria sobre a motilidade espermática, danos acrossomais e morte celular (PELLICER-RUBIO et al., 1997). Fosfolipídeos de membrana plasmática de espermatozóides, plasma seminal caprino (JAIN e ANAND, 1975) e componentes dos diluidores para a conservação de sêmen caprino (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989) (principalmente a lecitina, que é uma substância encontrada na gema do ovo e no leite) sofrem ação hidrolítica de uma lipase, produzindo substâncias com efeitos danosos a viabilidade espermática (PELLICER-RUBIO e COMBARNOUS, 1998). Assim, preconiza-se a remoção do plasma seminal para criopreservação de espermatozóides caprinos (TULI e HOLTZ, 1994).

Ao estudar o comportamento de espermatozóides epididimários incubados a 37°C com secreções das glândulas sexuais secundárias, verificou-se que as secreções vesiculares são capazes de neutralizar os efeitos altamente negativos das secreções bulbouretrais. Provavelmente, uma substância de baixo peso molecular seria um inibidor enzimático das enzimas produzidas pelas bulbouretrais, não permitindo a hidrólise e liberação dos fosfolipídeos na membrana plasmática dos espermatozóides e plasma seminal (NUNES, 1982). Com base nestes aspectos, pode-se afirmar que as secreções das glândulas sexuais secundárias, nos caprinos, possuem efeito desfavorável sobre o congelamento e a conservação dos espermatozóides nos protocolos convencionais (à base de gema de ovo ou leite), mas apresentam várias funções na capacitação e fertilização dos espermatozóides caprinos. Várias enzimas necessitam de cofatores para sua atividade (ALBERTS et al., 1997), por exemplo o íon cálcio (Ca^{++}), que é um importante cofator das enzimas envolvidas na

capacitação espermática (CROSS, 1998). As glândulas vesiculares também secretam o íon cálcio (LUKAC et al., 1976), o que demonstra que as glândulas sexuais secundárias também são responsáveis por secretar cofatores enzimáticos para regulação da atividade enzimática no plasma seminal. Com base nestes aspectos, pode se afirmar que existe uma complexa interação entre enzimas, cofatores e inibidores enzimáticos que regulam o metabolismo espermático.

Devido ao fato do caprino ser um animal estacional, muitas pesquisas foram realizadas dentro e fora da estação reprodutiva. Modificações histológicas das células epiteliais das glândulas vesiculares foram observadas durante a estação reprodutiva. As células no epitélio glandular das vesículas são cilíndricas, altas, e com núcleos alongados e volumosos, enquanto fora da estação reprodutiva são pequenas e cúbicas (Leidl, 1958, citado por NUNES, 1982). Adicionalmente Iritani et al. (1964), citados por NUNES (1982), analisando as secreções das glândulas anexas de bodes dentro e fora da estação reprodutiva, verificaram que a produção das glândulas vesiculares dentro da estação foi muito superior. Os autores verificaram ainda que as concentrações de ácido cítrico, ácido láctico e proteínas no plasma seminal também diminuíram. A riboflavina, uma vitamina secretada pelas glândulas vesiculares (responsável pela coloração amarelada no sêmen caprino), tem sua maior produção durante a estação reprodutiva, e sua concentração no plasma seminal possui alta correlação com a concentração das principais substâncias produzidas nas glândulas vesiculares, como a frutose e o ácido cítrico, sendo uma importante ferramenta para avaliar o funcionamento das glândulas vesiculares de bodes (MENDONZA et al., 1989).

CAPÍTULO 1

CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO PLASMA SEMINAL E VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM BODES DA RAÇA PARDA ALPINA AVALIADA POR MEIO DOS TESTE HIPOOSMÓTICO E TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA

1. INTRODUÇÃO

Várias técnicas complementares são utilizadas para prever a fertilidade seminal dos caprinos. O teste de termorresistência lento é de grande aceitação porque submete o sêmen a condições de temperatura semelhantes à que os espermatozoides ficam expostos no trato genital feminino (BARNABE et al., 1981), porém não consegue avaliar todos os aspectos relacionados à qualidade seminal. O teste hipoosmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, e é utilizado para prever um dos aspectos da qualidade seminal (CORREA e ZAVOS, 1994), visto a grande influência da atividade bioquímica das membranas plasmáticas dos espermatozoides nos processos de capacitação espermática e fertilização.

Outro aspecto da qualidade seminal é a composição bioquímica do plasma seminal, porque a concentração dos compostos bioquímicos do plasma seminal de caprinos aumenta entre as épocas seca e chuvosa, provavelmente

devido à melhoria na oferta de alimentos (PINHEIRO et al., 1996b). Estudos bioquímicos estão sendo feitos para entender a influência dos compostos bioquímicos, encontrados no plasma seminal, sobre a qualidade seminal de bodes (MENDONZA et al., 1989; PINHEIRO et al., 1996a).

Este experimento teve como objetivo estudar a relação entre a concentração protéica total do plasma seminal, o teste hipoosmótico, o teste de termorresistência lento e os aspectos físicos e morfológicos do sêmen de bodes da raça Parda Alpina.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Animais e preparo das amostras de sêmen

Este estudo foi realizado durante o verão (meses de janeiro e fevereiro de 2001), no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, situado no município de Viçosa, a 20°45'20" latitude S e 42°52'40" W Gr, com altitude média de 752,5 m, temperatura média anual de 20,9°C, índice pluviométrico anual de 1203 mm e clima com inverno seco e verão chuvoso (FERREIRA et al., 1998). Os dados climatológicos da região de Viçosa foram cedidos pela estação climatológica principal do Instituto Nacional de Meteorologia, situada no município de Viçosa.

Foram utilizados quatro reprodutores adultos da raça Parda Alpina com idades variando de 1,5 a 6 anos, criados em condições intensivas, com alimentação constituída de 50% de silagem de milho, 30% de milho desintegrado com palha e sabugo + 5% de uréia, e 20% de polpa cítrica, obtendo-se um valor nutricional de 1,47% de energia líquida (mcal), 11,68% de proteína bruta, 30,88% de fibra detergente neutro, 0,53% de cálcio e 0,24% de fósforo. O sal mineral e água foram fornecidos *ad libitum*. O controle sanitário (anti-helmíntico e vacinação) foi realizado periodicamente no rebanho, conforme critérios estabelecidos no capril.

As coletas de sêmen foram realizadas durante o turno da tarde empregando-se o método de vagina artificial com o auxílio de uma fêmea em estro induzido com a aplicação de estrógeno (cipionato de estradiol) (Merial Saúde Animal Ltda.) via intramuscular, a cada 10 dias. Foram coletados 15 ejaculados por animal. Os ejaculados foram submetidos à avaliação física e morfológica, e foram realizados os testes hipoosmótico e isoosmótico em todas as coletas. Do total de 60 ejaculados, em função do baixo volume dos ejaculados, em 28 amostras foram estimadas a concentração protéica total do plasma seminal, e 20 foram submetidas aos testes de termorresistência.

2.2. Avaliação física e morfológica do sêmen

A avaliação física do sêmen compreendeu os seguintes aspectos: o volume do ejaculado, a motilidade espermática progressiva retilínea, o turbilhonamento, o vigor e a concentração espermática de acordo com os critérios preconizados pelo COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA (1998). Uma gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C, onde se observou, com auxílio de microscopia óptica com aumento de 100x, o turbilhonamento (movimento em massa em escala de 0 a 5). Após colocar uma gota de sêmen sobre uma lâmina e depois uma lamínula sobre a gota, com aumento de 400x, verificou-se a motilidade progressiva retilínea (percentual), e o vigor espermático (escala de 0 a 5). Depois, acrescentou-se 10µl do sêmen em 4 ml de solução formol-salina tamponada (HANCOCH, 1957) para realização da contagem das células espermáticas por meio do uso de câmara de Neubauer, determinando a concentração espermática por ml e no ejaculado total.

Em um microtubo contendo 0,5mL de formol-salina tamponada foi adicionada uma alíquota do ejaculado suficiente para turvar a solução, sendo o microtubo estocado para posterior análise morfológica espermática em preparação úmida com auxílio de microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x. Foram contabilizadas 200 células por cada ejaculado, verificando-se os

percentuais de defeitos espermáticos, segundo os critérios adotados por BLOMM (1973) em defeitos maiores, menores e totais, sendo os resultados classificados de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) em animais aptos ou não aptos à reprodução.

2.3. Teste hipoosmótico

O teste hipoosmótico foi realizado no sêmen *in natura* segundo o protocolo adotado por REVELL e MRODE (1994). Sendo uma amostra de 10µl de sêmen homogeneizada em 1ml de solução previamente aquecida a 37°C e posteriormente incubada por 1 hora a 37°C. Foram utilizadas duas soluções com osmolaridades de 100 e 290mOsm/kg para o sêmen, sendo última a isoosmótica (Tabela 1). A osmolaridade de 100mOsm/kg foi utilizada por SOUSA et al. (2000) e FONSECA et al. (2001), que concluíram que esta osmolaridade é a indicada para viabilizar o teste hipoosmótico em sêmen caprino *in natura*. Depois do período de incubação, uma gota da solução foi depositada sobre uma lâmina previamente aquecida em uma placa aquecedora (38°C), e colocada uma lamínula (também previamente aquecida) sobre a gota, sendo retirado o excesso de líquido com auxílio de um papel de filtro. Foram contados 200 espermatozóides em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000X sob uma gota de óleo de imersão, e verificou-se o percentual de espermatozóides que apresentaram seu flagelo curvando-se junto à membrana plasmática expandida. Foram utilizados os critérios de dobramento de cauda conforme descrito por REVELL e MRODE (1994) para sêmen bovino. Segundo os autores, os graus de enrolamento dependem da quantidade de água que entra na célula até que ocorra o equilíbrio entre os meios extracelular e intracelular. Os espermatozóides que estavam com a membrana intacta e reagiram ao tratamento, com cauda levemente dobrada, cauda dobrada e fortemente dobrada foram contabilizados.

Tabela 1 - Composição das soluções hipoosmótica e isoosmótica

	Hipoosmótica	Isoosmótica
Frutose (g)	0,9	2,61
Citrato trissódico (g)	0,49	1,421
Água tridestilada (q.s.p)	100 ml	100 ml
Osmolaridade (mOsm/kg)	100	290

2.4. Concentração protéica do plasma seminal

Determinou-se a concentração protéica das proteínas solúveis ($\mu\text{g/mL}$) das amostras de plasma seminal conservadas em nitrogênio líquido com o auxílio de um espectrofotômetro, empregando-se o protocolo preconizado por BRADFORD (1976).

2.4.1. Separação do plasma seminal do ejaculado

Após a avaliação física e retirada de alíquota de sêmen para a análise morfológica, o ejaculado foi diluído em solução fisiológica (0,9%) na proporção de 1:9 e centrifugado a 700 g durante 10 minutos à temperatura ambiente, para separar o plasma seminal dos espermatozóides. Posteriormente, o plasma foi envasado em palhetas médias (0,5 mL) e conservado em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior análise da concentração protéica.

2.4.2. Preparo do reagente

As seguintes substâncias foram utilizadas para preparo do reagente: Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol a 95%, e ácido fosfórico a 85%. Em

50 mL de solução de etanol a 95% foram dissolvidos 100 mg do reagente Coomassie Brilliant Blue. A esta solução adicionaram-se 100 mL de solução de ácido fosfórico a 85%. A seguir, esta solução foi diluída até o volume de 200 mL com água tridestilada (solução estoque). Antes da utilização nos ensaios, a solução estoque foi diluída com água tridestilada para volume final de 1000 mL (cinco vezes o volume da solução estoque).

2.4.3. Preparo da curva padrão e determinação da concentração protéica

Com o uso de uma solução de albumina sérica bovina (BSA) diluída em solução fisiológica (1 mg/mL) foram feitas diferentes diluições para o preparo da curva padrão para o reagente. De cada diluição protéica 100 µl foram adicionados em 1mL do reagente diluído, sendo a absorbância medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 595 nm, com um tempo de reação de 2 a 30 minutos. Após a determinação da curva padrão e ajuste linear dos dados foi obtida a equação para determinação da proteína total das amostras (Figura 1).

As amostras de plasma seminal depois de descongeladas foram acondicionadas em microtubos (1,5 ml) e centrifugadas a 150 g durante 5 min para a completa remoção dos espermatozoides. A seguir, 100 µl do sobrenadante foram diluídos e homogeneizados em 900 µl de solução fisiológica em tubo de ensaio. Depois, 100 µl dessa solução final foram adicionados a 1 mL do reagente (previamente diluído) em tubo de ensaio, e após 2 minutos o conteúdo foi depositado em cubetas de vidro para medir a absorbância das reações e estimar a concentração protéica desta solução com base na equação encontrada (Figura 1).

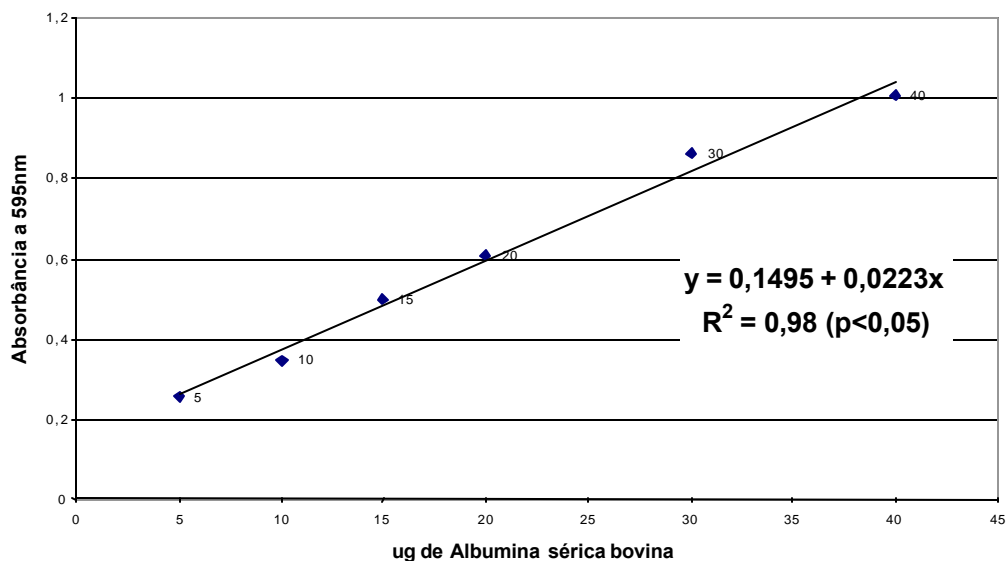


Figura 1 - Curva padrão para estimar a concentração protéica.

2.5. Teste de termorresistência lento

O teste de termorresistência lento consiste em submeter o sêmen *in natura* ao estresse térmico. O sêmen foi diluído na proporção de 1:4 com solução contendo citrato de sódio, frutose, penicilina e estreptomicina (solução B da Tabela 2) (MIES FILHO, 1982), sendo 1 mL retirado e acondicionado em microtubos (1,5 mL) e recoberto por uma fina camada de óleo mineral para ser submetido a 3 horas de incubação em banho-maria à temperatura de 37°C. Durante o período de incubação, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos aspectos de motilidade espermática progressiva retilínea e ao vigor espermático, nos intervalos de 0, 60, 120, 180 minutos (MIES FILHO, 1982).

Tabela 2 - Composição da solução utilizada no teste de termorresistência

Solução A

2,94 g de citrato de sódio

100 mL de água tridestilada qsp

Solução B

73 mL da solução A

1 g de D-frutose

0,064 g de penicilina G potássica

0,01 g de sulfato de estreptomicina

2.6. Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* SAEG versão 7.0.

O teste Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade das respostas das variáveis estudadas. A homogeneidade das variâncias foi estudada, utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett.

As análises descritivas quanto às médias, desvios-padrão e coeficientes de variação foram feitas para todas as variáveis estudadas. A análise de variância foi utilizada para avaliar os efeitos dos bodes, e dos dias de coleta sobre os testes complementares realizados no sêmen (hiposmótico, teste de termorresistência lento) e concentração protéica do plasma seminal. Ao detectar efeito pelo teste F, os dados foram comparados pelo teste de Tukey com probabilidade de erro de 5%. Os resultados das incubações nas soluções isoosmótica, e hiposmótica, e o total de caudas dobradas na morfologia espermática foram comparados pelo teste “t”.

A análise de regressão foi utilizada para verificar o comportamento das variáveis estudadas, durante o período experimental, e o comportamento da motilidade espermática progressiva no teste de termorresistência. As correlações de Pearson foram realizadas para verificar as relações entre as características seminais e os testes realizados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume do ejaculado, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático, turbilhonamento e concentração espermática por mL do sêmen não diferiram entre os dias de coleta ($p > 0,05$), mas foram detectadas diferenças entre os bodes (Tabela 3). Em relação à motilidade espermática progressiva retilínea e à concentração espermática por mL, apenas o animal 37 foi inferior aos demais ($p < 0,05$), apresentando uma queda acentuada na motilidade espermática progressiva retilínea durante e no final do experimento (Figura 2). Ao analisar o turbilhonamento e o vigor espermático, novamente o animal 37 é inferior aos demais ($p < 0,05$), e os animais 33 e 40 com uma posição intermediária entre o animal 37 e o animal 58, que apresentou os melhores resultados em todas as características físicas estudadas, exceto em relação ao volume do ejaculado, em que o bode 40 foi superior aos demais ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina

Bodes	Volume	Motilidade (%)	Vigor	Turbilhonamento	Spzt 10 ⁶ /mL
33	1,05 ± 0,38 ^b	88,33 ± 6,45 ^a	3,83 ± 0,36 ^{ab}	4,13 ± 0,39 ^b	3498 ± 1253 ^a
37	1,00 ± 0,38 ^b	50,33 ± 19,12 ^b	2,53 ± 0,63 ^c	2,03 ± 1,04 ^c	2366 ± 851 ^b
40	1,44 ± 0,42 ^a	82,33 ± 5,93 ^a	3,40 ± 0,47 ^b	3,63 ± 0,48 ^b	3460 ± 879 ^a
58	0,84 ± 0,35 ^b	91,33 ± 3,51 ^a	4,03 ± 0,48 ^a	4,80 ± 0,36 ^a	3902 ± 1162 ^a
<i>Média geral</i>	1,08 ± 0,43	78,08 ± 19,48	3,45 ± 0,75	3,65 ± 1,2	3306 ± 1174
CV	40,11	24,95	21,95	32,91	35,51

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%. Volume = volume do ejaculado; Motilidade (%) = motilidade progressiva retilínea; Vigor = vigor espermático; Turbilhonamento = movimento de massa; Spzt 10⁶/ml = concentração espermática por milhão em 1 ml; CV = coeficiente de variação.

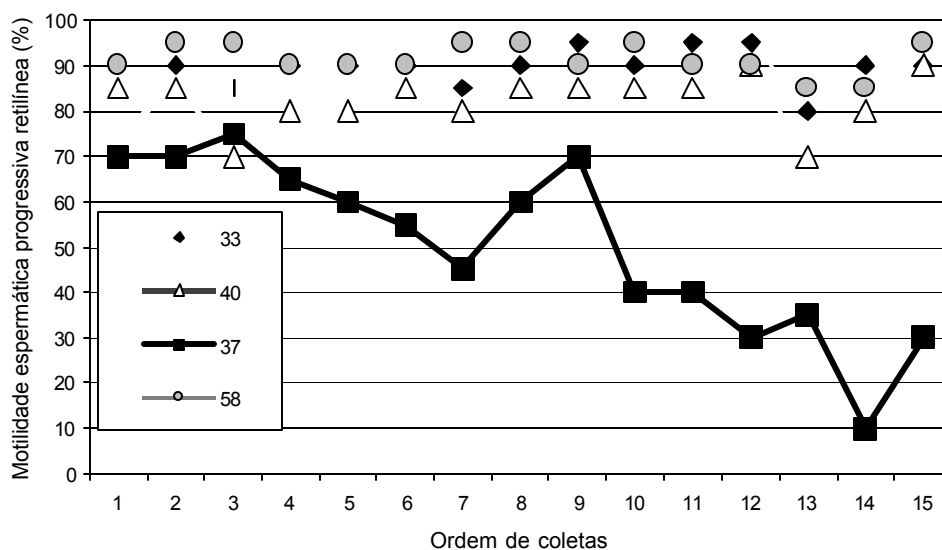


Figura 2 - Valores absolutos de motilidade espermática progressiva retilínea registrados nos ejaculados de bodes adultos da raça Parda Alpina (bodes 33, 37, 40 e 58) durante o período experimental.

Os resultados obtidos relacionados aos volumes dos ejaculados são semelhantes aos encontrados na literatura para o período de verão (VINHA, 1975; KARATZAS et al., 1997; SOUSA et al., 2000). As médias gerais de motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático e turbilhonamento durante o verão (período do experimento) foram menores que as encontradas por SANTOS (2001) estudando o mesmo rebanho e instalações durante a primavera, o que corroboram com os achados de VINHA (1975), que observou os maiores percentuais de espermatozóides móveis (motilidade progressiva retilínea), na primavera, em bodes da raça Anglonubiana no Estado de Minas Gerais.

Os valores médios para o percentual de defeitos maiores, menores, totais e de caudas dobradas encontradas na morfologia espermática não diferiram entre as coletas ($p > 0,05$), mas diferiram entre os bodes ($p < 0,05$) (Tabela 4). O bode 37 apresentou os maiores percentuais de defeitos maiores e totais entre os demais ($p < 0,05$), mas em relação aos percentuais de defeitos menores não diferiu do bode 33 ($p > 0,05$). Em relação ao percentual de caudas dobradas encontradas na morfologia espermática o bode 37 diferiu do animal 58 ($p < 0,05$), e os animais 33 e 40 apresentaram uma posição intermediária não diferindo dos bodes 37 e 58 ($p > 0,05$).

Os espermatozóides não ejaculados são gradualmente eliminados pela urina, e os não eliminados sofrem gradual degeneração, aumentando o percentual de defeitos espermáticos totais nos primeiros ejaculados após um período de repouso sexual (HAFEZ, 1995). Observando a Figura 3, verifica-se este aumento de defeitos espermáticos para os animais mais velhos (33 e 37), nas primeiras coletas, mas entre os animais jovens (40 e 58) não foi observado, o que pode ser atribuído à maior frequência de sodomismo e masturbação nos animais jovens e, conseqüentemente, ausência de repouso sexual (GUIMARÃES, 2001).

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão dos aspectos morfológicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina

Bodes	Maiores	Menores	Totais	Cauda
33	5,06 ± 1,63 ^b	10,33 ± 7,95 ^{ab}	15,36 ± 8,42 ^b	4,63 ± 1,57 ^{ab}
37	15,63 ± 14,10 ^a	16,53 ± 11,9 ^a	32,16 ± 22,08 ^a	5,16 ± 4,88 ^a
40	3,53 ± 1,44 ^b	6,40 ± 4,44 ^b	9,93 ± 4,52 ^b	2,56 ± 1,96 ^{ab}
58	3,00 ± 1,63 ^b	4,63 ± 3,94 ^b	7,63 ± 3,86 ^b	2,26 ± 1,60 ^b
<i>Média geral</i>	6,80 ± 8,71	9,46 ± 8,84	16,27 ± 15,31	3,65 ± 3,06
CV	128	93,43	94,11	78,21

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (p<0,05) pelo teste de Tuckey a 5%; Maiores (%) = percentagem de defeitos maiores; Menores = percentagem de defeitos menores; Totais = percentagem de defeitos totais; Cauda = defeitos de cauda encontrados na morfologia espermática; CV = coeficiente de variação.

Quanto ao total de defeitos espermáticos do bode 37 teve um comportamento diferente do bode 33 nas coletas seguintes, isto é houve um aumento durante o período experimental dos defeitos espermáticos totais (Figura 3). O animal 37 sofreu com o manejo de coletas associado a altas temperaturas e à sua condição física. A impossibilidade de articulação do membro posterior esquerdo devido a um acidente anterior não impossibilitou que ele fosse coletado, mas o cansou-o mais durante as coletas, visto que o animal possui uma libido muito boa e é muito bem condicionado ao método de coleta. Nas primeiras três semanas do experimento, foi observada uma diminuição do escore corporal desse animal que apresentava sinais de estresse e cansaço. Nas Figuras 2 e 3, observa-se que a diminuição da motilidade progressiva retilínea e o aumento do percentual de defeitos totais do bode 37 ocorreram simultaneamente.

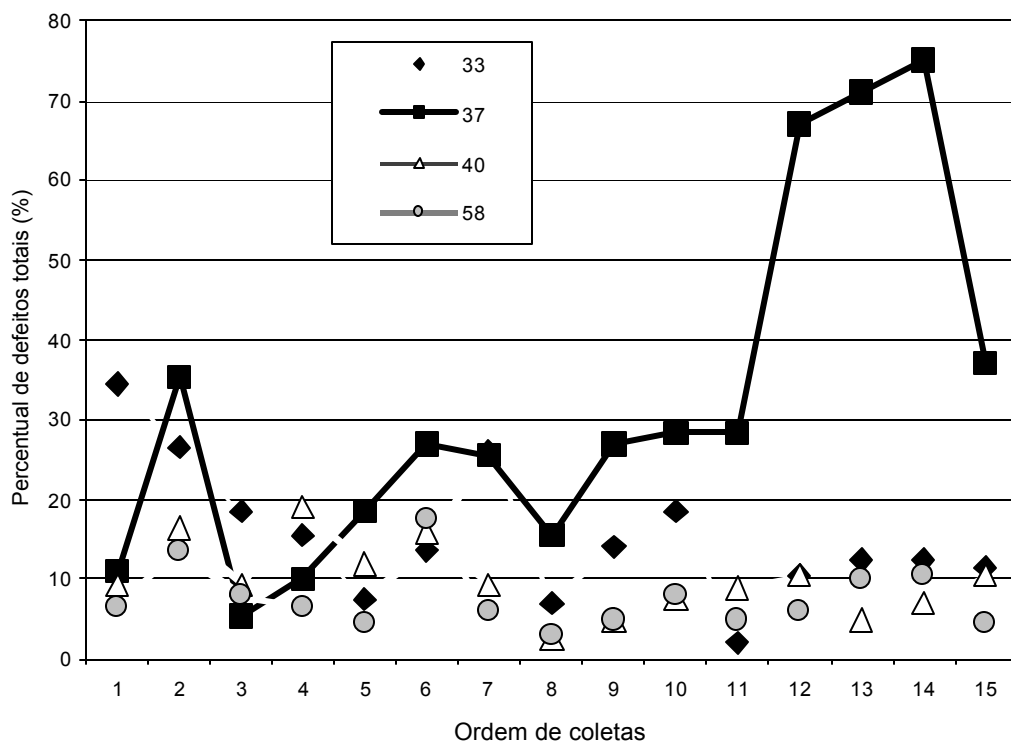


Figura 3 - Valores absolutos dos defeitos totais apresentados por cada animal (bodes 33, 37, 40 e 58) durante os dias de coletas.

Certas condições de ambiente associadas ao manejo podem exercer um efeito potencialmente ativo no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e no eixo simpático-medular adrenal de animais domésticos, atuando como agente estressor (MINTON, 1994). Em relação à reprodução, os hormônios relacionados ao estresse alteram o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, inibindo a função hipotalâmica, diminuindo a liberação dos hormônios da adenohipófise (Folículo estimulante e Luteinizante) e, conseqüentemente, a produção de andrógenos pelos testículos, o que interfere nos sistemas regulatórios de feedbacks negativos entre os testículos e o eixo hipotalâmico-adenohipofisário. Assim, como o epitélio do epidídimo é extremamente sensível aos níveis de testosterona (HAFEZ, 1995), a função epididimária também é alterada. O percentual de anormalidades espermáticas aumenta e a qualidade espermática diminui, nessas condições de estresse (BARTH e OKO, 1989).

Defeitos de cauda também são originados nos epidídimos, por exposição dos espermatozoides epididimários a secreções anormais durante o trânsito epididimário (CURY e VINHA, 1982). O bode 37 apresentou altos desvios-padrão para os defeitos de cauda (Tabela 4). Grandes percentuais de gotas citoplasmáticas proximais são considerados como sinal de anormalidade no processo de espermiogênese, e são comumente associados a uma variedade de defeitos morfológicos espermáticos e diminuição da qualidade seminal (BARTH, 1989). Neste experimento, a média e desvio-padrão do percentual de gotas citoplasmáticas do bode 37 foi $8,41 \pm 7,83$ com grande aumento no final do experimento, quando a qualidade seminal teve uma queda muito acentuada (Figuras 2 e 3).

Cabeças isoladas geralmente ocorrem no trânsito epididimário e podem ser resultado de uma variedade de distúrbios, que ocorrem durante a espermiogênese ou maturação espermática. Um aumento no percentual de cabeças isoladas é freqüentemente observado como um fenômeno associado à degeneração testicular ou uma condição inflamatória das glândulas vesiculares, ampolas e epidídimos (BARTH, 1989). O bode 37 apresentou média e desvio padrão de $13,13 \pm 12,67$ para o percentual de cabeças isoladas normais, e $6,83 \pm 5,83$ para cabeças isoladas patológicas, e não foi observada a presença de leucócitos no sêmen, o que indicou ausência de processos inflamatórios (BARTH, 1989). Os grandes valores de desvios-padrão encontrados mostram as variações durante o período, apresentando os maiores valores no final do experimento. As cabeças isoladas patológicas começaram a aparecer no final do experimento, além dos altos percentuais de cabeças isoladas normais e defeitos espermáticos totais.

A temperatura testicular, normalmente, deve estar 3 a 4°C abaixo da temperatura corporal para ocorrer a espermatogênese normal no touro (KASTELIC et al., 1997). Os testículos protegem-se do calor por meio de mecanismos termorreguladores que incluem a sudorese local feita por ação das glândulas sudoríparas da pele escrotal, a contração do músculo cremaster, e um mecanismo circulatório via plexo pampiniforme (HAFEZ, 1995). Entretanto, os

mecanismos de termorregulação possuem limitações quando os animais encontram-se em áreas de elevadas temperaturas ambientais e umidade relativa do ar.

A temperatura ambiente média de 27°C é suficientemente alta para reduzir a qualidade seminal, em ovinos, e ocasionar mudanças metabólicas e ultra-estruturais nos espermatozóides. Quando a temperatura ambiente excede a temperatura crítica superior (25°-27°C), a umidade relativa do ar passa a ter importância fundamental nos mecanismos de dissipação de calor devido o ar úmido saturado inibir a evaporação da água através da pele e do trato respiratório, tornando o ambiente mais estressante para o animal (CURTIS, 1983).

O comportamento dos valores médios das temperaturas máximas e mínimas indica que o clima de Viçosa pode ser considerado temperado, com verão quente e chuvoso. A ocorrência das maiores temperaturas na região de Viçosa esta entre 28,1°C e 30°C, sendo que para os meses de janeiro, fevereiro e março, há uma tendência a distribuição normal em torno desses valores, sendo as máximas anuais registradas no mês de janeiro e fevereiro (FERREIRA et al., 1998).

As médias da temperatura e umidade relativa do ar foram de 23°C e 80% no mês de janeiro, e 24,5°C e 74% no mês de fevereiro, pois as chuvas nestes meses aumentam a umidade relativa do ar. As médias e os valores de desvios-padrão das temperaturas máximas foram $29,5^{\circ}\text{C} \pm 2,08$ e $32,42 \pm 1,2$ para os meses de janeiro e fevereiro respectivamente. Durante o período experimental, as médias das temperaturas diárias e máximas foram 24,2°C e 31,6°C, respectivamente. A Figura 4 mostra que as temperaturas máximas durante o período experimental foram aumentando, atingindo os maiores valores no início de fevereiro (terço final do experimento). As coletas foram realizadas à tarde, quando as temperaturas máximas ocorrem com maior frequência, assim influenciando ainda mais as respostas fisiológicas do animal 37 frente as condições de estresse a ele submetido.

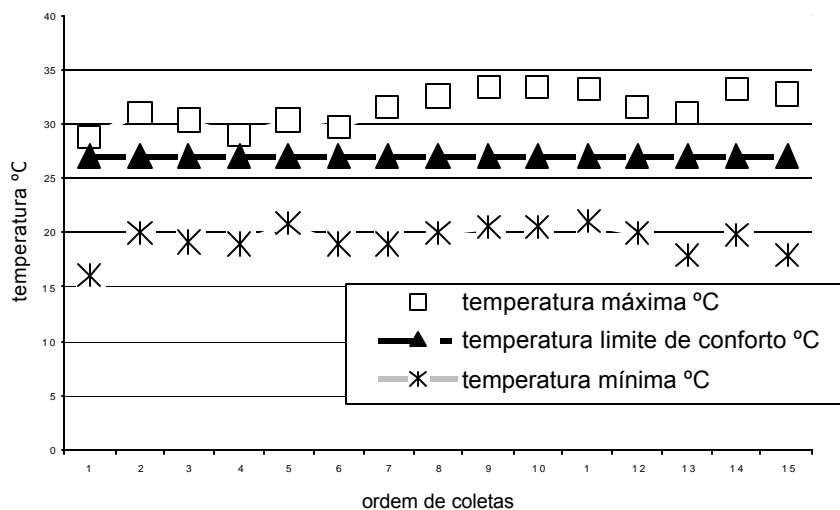


Figura 4 - Temperaturas máximas e mínimas na região de Viçosa observadas durante os dias de coletas comparadas com a temperatura limite de conforto térmico.

O bode 37 esteve apto à reprodução, conforme os critérios preconizados pelo CBRA (1998) até aproximadamente o terço final do experimento, quando teve uma queda na qualidade seminal muito acentuada. A suspeita de que o bode 37 apresentou um quadro de estresse agudo em resposta ao manejo de coleta a ele submetido é confirmada, quando compara-se a fertilidade desse bode com a dos outros quatro bodes, pois, não foram detectadas diferenças na fertilidade entre os animais durante a estação de monta, que ocorreu depois da execução deste experimento ($p > 0,05$). O animal 37 teve alguns dias para recuperação, visto que neste ano houve um atraso no cio das novilhas.

Os animais 33, 40 e 58 apresentaram-se aptos à reprodução, de acordo com os critérios preconizados pelo CBRA (1998), durante todo o período experimental, e ressalta-se que os mesmos apresentaram ejaculados de excelente qualidade durante todo o experimento.

Os animais números 33 e 37 com os maiores percentuais de caudas dobradas em relação aos demais reprodutores no sêmen *in natura*, também

tiveram, após a incubação em solução isoosmótica, os maiores percentuais de caudas dobradas ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão dos percentuais de caudas dobradas encontradas depois da incubação de sêmen caprino nas soluções isoosmótica e hipoosmótica

Bodes	Isoosmótico	Hipoosmótico
33	10,89 ± 3,31 ^a	30,64 ± 9,67 ^a
37	9,17 ± 4,84 ^a	18,64 ± 7,00 ^b
40	5,00 ± 2,87 ^b	18,64 ± 6,35 ^b
58	3,96 ± 2,37 ^b	30,42 ± 7,52 ^a
<i>Total geral</i>	7,25 ± 4,44	24,58 ± 9,62
CV	61,28	39,14

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%.

O teste isoosmótico apresentou correlações positivas e altas com os defeitos espermáticos encontrados no sêmen *in natura*, sendo 0,55 com defeitos maiores, 0,46 com defeitos menores, 0,57 com defeitos totais e 0,67 com caudas dobradas. Mas, o percentual de caudas dobradas na incubação isoosmótica foi superior ao percentual de caudas encontradas no sêmen *in natura* ($p < 0,05$). Tais observações discordam de diversos estudos que concluíram que a incubação em solução isoosmótica não altera a morfologia da cauda dos espermatozóides (RODRIGUEZ-GIL et al., 1994; CAIZA et al., 1997; VAZQUEZ et al., 1997; VAZ DE MELO, 1999).

Com relação ao teste hipoosmótico, os bodes 33 e 58 que foram superiores aos demais quanto à motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático e turbilhonamento ($p < 0,05$) (Tabela 3), que são as principais características físicas do sêmen para avaliação (LENA, 1997), também foram

superiores aos demais no percentual de caudas dobradas após o período de incubação em solução hipoosmótica ($p < 0,05$) (Tabela 5), o que era esperado devido esses dois bodes apresentarem os melhores ejaculados. As correlações encontradas do teste hipoosmótico com a motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático no sêmen *in natura* foram positivas e baixas (0,28 e 0,24 respectivamente), concordando com os achados de VAZ DE MELO (1999) e BUENO (2000). Contudo, esperava-se maior correlação com a motilidade espermática progressiva retilínea, por ser esta uma das principais características físicas para predizer a qualidade do sêmen (LENA, 1997). Mas, com o turbilhonamento e concentração espermática por mL as correlações foram positivas e médias (0,36 para as duas características), o que também era esperado devido o turbilhonamento ser uma característica física importante na avaliação andrológica, enquanto a concentração espermática por mL é um bom indicativo da função testicular (LENA, 1997).

O percentual de caudas dobradas, após a incubação hipoosmótica, foi superior ao da incubação isoosmótica e ao percentual encontrado no sêmen *in natura* ($p < 0,05$). Na Figura 5, observa-se que os percentuais de caudas dobradas após o período de incubação em solução isoosmótica e no sêmen *in natura*, foram semelhantes, mas os coeficientes de variação foram altos (61,28 e 78,21), o que pode ter influenciado os resultados do teste “t” ao detectar diferenças entre os dados obtidos nas avaliações.

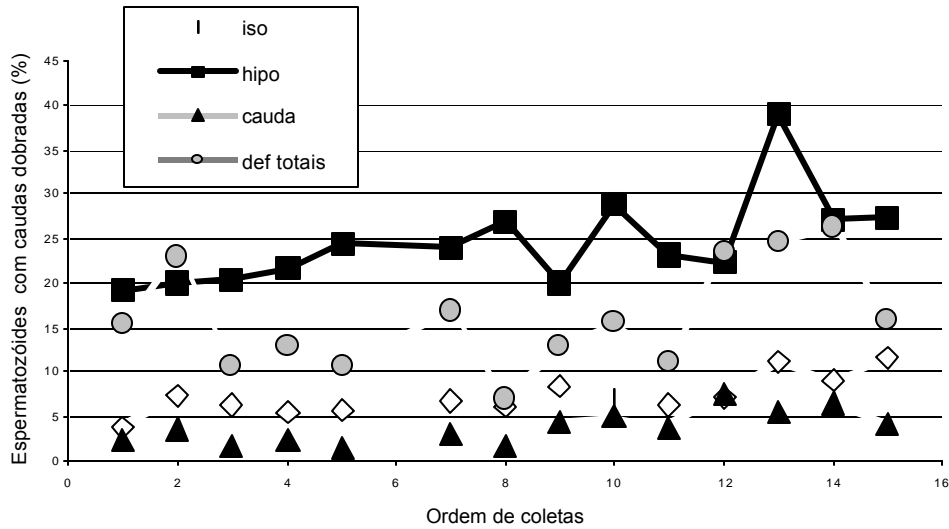


Figura 5 - Médias obtidas nos testes isoosmótico (iso), hipoosmótico (hipo), médias dos percentuais de caudas dobradas encontradas na morfologia espermática (cauda) e defeitos espermáticos totais (def. totais) durante as coletas.

As altas temperaturas provocam diminuição da qualidade do sêmen e comprometimento estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides (HUANG et al., 2000). Apesar das altas temperaturas não terem sido suficientes para provocar alterações no volume, na concentração e morfologia espermática até o término do experimento, elas foram suficiente para provocar imediatas alterações na integridade da membrana, provavelmente alterando o processo de maturação epididimária, e resultando em alteração estrutural da membrana plasmática e diminuição dos dobramentos de cauda frente ao meio hipoosmótico, concordando com SANTOS (2001). A média obtida neste experimento, do percentual de caudas dobradas na incubação hipoosmótica (24,58%) foi menor do que a obtida por SANTOS (2001) utilizando a osmolaridade de 60mOsm/kg durante a primavera (57,2%), devido as maiores médias e temperaturas máximas ocorrerem durante verão (FERREIRA et al., 1998), assim aumentando os efeitos danosos à membrana plasmática dos espermatozoides. Entretanto, SOUSA et al. (2000) utilizando a osmolaridade de 100mOsm/kg obteve média de 84,9% no

percentual de caudas dobradas na incubação hipoosmótica, diferença esta muito alta no presente experimento. Mas o autor utilizou um protocolo diferente do adotado no presente experimento, isto é incubou 100ul de sêmen em 1 mL de solução hipoosmótica, durante 25 minutos, e depois fixou o material em gluteraldeído a 2% para ser feito o esfregaço e contabilizados 100 espermatozóides em microscópio de contraste de fase (1000 x). O tempo de incubação de 1 hora pode aumentar a osmolaridade da solução devido à evaporação, e diminuir os dobramentos de cauda no teste hipoosmótico. Muitas vezes não é possível a observação de alterações como edema de peça intermediária e acrossoma, achados que confirmam a reação ao meio hipoosmótico (VAZ DE MELO, 1999; REVELL e MRODE, 1994), então, foram contabilizados conjuntamente todos os defeitos de caudas dobradas nas incubações isoosmótica e hipoosmótica.

Percentuais de caudas dobradas tão baixos, utilizando solução de 100mOsm/kg e período de incubação de 30 minutos, foram encontrados em garanhões ($29,5 \pm 7,4$) (NEILD, 1999). O autor ainda encontrou correlação alta (0,75) do teste hipoosmótico com a motilidade espermática progressiva retilínea no sêmen *in natura*.

Ao analisar os dados observados no teste de termorresistência lento, não foi observada diferença entre os dias de coleta na motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático ($p > 0,05$), mas houve diferença entre os animais, em que apenas o animal número 37 foi inferior aos demais ($p < 0,05$) (Tabela 6), embora o comportamento de queda da motilidade espermática progressiva retilínea, durante o período de incubação, no teste de termorresistência, foi semelhante à apresentada pelo sêmen dos demais reprodutores (Figura 6).

Tabela 6 - Valores médios, desvios-padrão e coeficiente de variação da motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático após 3 horas de incubação do sêmen de bodes da raça Parda Alpina no teste de termorresistência lento

Bodes	Motilidade após 3 horas	Vigor espermático após 3 horas
33	70 ± 7,07a	2,5 ± 0,57 ^a
37	15 ± 7,9b	1 ± 0,01 ^b
40	58 ± 5,7a	2,5 ± 0,57 ^a
58	70 ± 7,9a	2,25 ± 0,5 ^a
<i>Média geral</i>	53,25 ± 24,13	2,06 ± 0,77
CV	45,31	37,42

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%. Motilidade após 3 horas = motilidade progressiva retilínea após a incubação no teste de termorresistência; *Geral* = média geral; CV = coeficiente de variação.

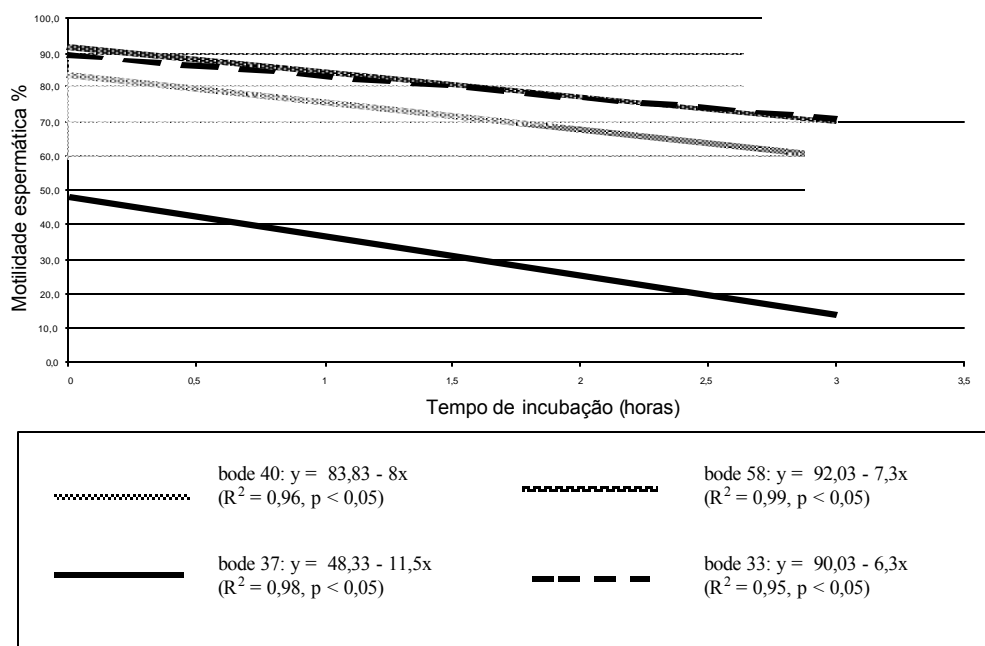


Figura 6 - Motilidade espermática progressiva retilínea em função do tempo durante o teste de termorresistência realizado no sêmen de bodes da raça Parda Alpina.

A motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático, após 3 horas de incubação, no teste de termorresistência tiveram correlações altas e positivas com o percentual de caudas dobradas após a incubação no meio hipoosmótico (0,67 e 0,50 respectivamente), corroborando com os achados de BUENO (2000) (0,60 e 0,65 respectivamente), o que confirma a importância da integridade funcional da membrana plasmática na viabilidade espermática medida pelo teste de termorresistência lento.

A concentração protéica total do plasma seminal não apresentou diferença entre os bodes ($p > 0,05$) (Tabela 7), mas apresentou entre os dias de coleta ($p < 0,05$) (Tabela 8), embora não tenha apresentado comportamento linear, quadrático ou cúbico.

Tabela 7 - Valores médios e desvios padrão da concentração protéica do plasma seminal (g/dl) do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina

Bodes	Proteínas seminais g/dl
33	1,87 ± 0,83 ^a
37	1,81 ± 0,64 ^a
40	2,72 ± 1,75 ^a
58	2,77 ± 1,15 ^a
<i>Média geral</i>	0,022 ± 0,012
CV	52,26

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%.

Tabela 8 - Valores médios e desvios-padrão da concentração protéica total do plasma seminal (g/dl) do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina durante os dias de coleta

Ordem de coleta	Proteínas seminais g/dl
1	3,90 ± 1,70 ^a
4	1,80 ± 0,36 ^{ab}
7	2,60 ± 1,40 ^{ab}
10	1,40 ± 0,14 ^{ab}
12	1,50 ± 0,80 ^b
13	1,90 ± 0,82 ^{ab}
15	2,50 ± 0,48 ^{ab}
<i>Geral</i>	2,20 ± 1,20
CV	52,26

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (p < 0,05) pelo teste de Tuckey a 5%.

As médias de concentração protéica do plasma seminal encontradas neste experimento foram baixas, em relação à literatura consultada. PINHEIRO et al. (1996b), estudando os parâmetros bioquímicos do plasma seminal de três tipos raciais caprinos no Nordeste brasileiro, obteve médias e desvios-padrão de concentração protéica total do plasma seminal (g/dL) de bodes da raça Parda Alpina de $4,08 \pm 0,12$ e $3,37 \pm 0,16$ durante a estação chuvosa e seca, respectivamente. Não houve diferença entre os tipos raciais estudados por PINHEIRO et al. (1996b) (Parda Alpina, Moxóto e 1/2 Pardo Alpina x Moxotó), mas a concentração foi maior na época chuvosa. Em outro experimento, SANTOS et al. (1998) estudando a variação dos componentes bioquímicos do plasma seminal, após estresse térmico aplicado com bolsa térmica diretamente sobre os testículos, encontraram discreta oscilação nos valores médios. As médias e desvios-padrão para concentração protéica do plasma seminal (g/dL) de bodes da raça Moxóto e mestiço Pardo Alpino x Moxotó foram $5,14 \pm 1,09$ e

4,65 \pm 0,6 respectivamente. Ressalta-se que PINHEIRO et al. (1996b) e SANTOS et al. (1998) utilizaram o método do biureto para determinação da concentração protéica, método com sensibilidade diferente do utilizado neste experimento, donde a dificuldade de comparar os dados deste experimento com a literatura consultada. SCOPE (1987) afirma que diferentes valores na concentração protéica são determinados em função do protocolo utilizado e de quais proteínas a solução protéica é constituída.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o teste hipoosmótico pode ser uma importante ferramenta para avaliação de sêmen caprino, visto a correlação com os principais aspectos da qualidade seminal e o teste de termorresistência lento.

A concentração protéica total do plasma seminal não apresentou relação com as características físicas e morfológicas do sêmen, bem como não se relacionou com os testes hipoosmótico e termorresistência, não sendo eficaz em prever a qualidade seminal no presente estudo.

CAPÍTULO 2

DESEMPENHO REPRODUTIVO E PERFIL PROTÉICO DO PLASMA SEMINAL E TESTE HIPOOSMÓTICO EM BODES DA RAÇA PARDA ALPINA EM REGIME DE MONTA CONTROLADA

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de testes para predizer a capacidade reprodutiva de bodes sob regime de monta natural vem crescendo, devido a aquisição de bodes com potencial reprodutivo comprovado ser uma importante ferramenta para aumentar os índices de produtividade na caprinocultura nacional (RIBEIRO, 1997). Diversos testes complementares são utilizados para predizer a fertilidade de machos, devido às altas correlações com o desempenho reprodutivo, além de diferentes aspectos da qualidade seminal serem mensurados em cada teste. Novas técnicas estão sendo desenvolvidas e estudadas juntamente com as análises de rotina (análise física e morfológica do sêmen) e com testes complementares já utilizados para avaliação andrológica (por exemplo, o teste de termorresistência) para melhor compreensão de seus resultados (LENA, 1997). O estudo dos componentes bioquímicos do plasma seminal pode ser uma alternativa para avaliar o funcionamento do aparelho reprodutor e qualidade seminal de bodes

(MENDONZA et al., 1989; PINHEIRO et al., 1996a; PINHEIRO et al., 1996b; SANTOS et al., 1998). Mas, a gestação é uma prova irrefutável de que o sêmen possui capacidade fecundante. Assim, é necessário que pesquisas sejam feitas, comparando os resultados dos testes complementares com o desempenho reprodutivo em regime de cobertura.

Este experimento teve como objetivo estudar as relações entre a concentração protéica total do plasma seminal, o teste hipoosmótico, a análise física e morfológica do sêmen e o desempenho reprodutivo de bodes da raça Parda Alpina em regime de monta controlada.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Animais e preparo das amostras de sêmen

Este estudo foi realizado durante o terço final do verão (final do mês de fevereiro até início do mês de abril de 2001) no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizados quatro reprodutores adultos da raça Parda Alpina com idades variando de 1,5 a 6 anos, criados em condições intensivas, com alimentação suplementação mineral e controle sanitário efetuado de acordo como descrito no 1.º experimento. O bode 37 foi excluído do experimento devido estar inapto à reprodução e perda de escore corporal durante o terço final do 1.º experimento, sendo substituído pelo bode 34.

As coletas de sêmen foram realizadas conforme descrito no Capítulo 1. Os bodes encontravam-se em regime de monta controlada. Total de 40 ejaculados foram obtidos, em todas as coletas. Além do exame físico e morfológico do sêmen, foram realizados os testes hipoosmótico, isoosmótico e a determinação da concentração protéica total do plasma seminal.

2.2. Avaliação física e morfológica do sêmen

A avaliação física e morfológica do sêmen foi feita como descrito no experimento 1, item 2.2.

2.3. Teste hipoosmótico

O teste hipoosmótico foi feito como descrito no experimento 1, item 2.3.

2.4. Concentração protéica do plasma seminal

A concentração protéica total do plasma seminal foi determinada, conforme descrito no experimento 1, item 2.4.

2.5. Estação de monta e diagnóstico de gestação

Os quatro bodes serviram um total de 63 cabras no período de 21 de fevereiro a 10 de abril de 2001. Os reprodutores foram utilizados sob regime de cobertura controlada, sendo as fêmeas levadas às baias de cada bode. O diagnóstico de gestação foi realizado por meio de exame ultra-sonográfico transabdominal (Ultra-som Pie-medical, modelo VET 200-Holanda), com transdutor de 5,0 MHz, sendo registrada como prenhez positiva a observação da vesícula embrionária ou do feto. Os exames ultra-sonográficos começaram 15 dias após o fim da estação de monta e terminaram no final do mês de abril.

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada, conforme descrito no experimento 1, item 2.6. Os dados relacionados com o número de coberturas e taxa de prenhez foram avaliados em tabela de contingência e testados pelo teste do Qui-quadrado, com probabilidade de 5% de erro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, não foram detectadas diferenças entre os dias de coleta nas características físicas dos ejaculados ($p > 0,05$), mas foram detectadas em relação aos animais na motilidade progressiva retilínea, vigor espermático, e concentração espermática por mL ($p < 0,05$) (Tabela 9). O animal número 33 apresentou superioridade nas características físicas do sêmen, em relação aos demais reprodutores ($p < 0,05$), e o animal número 58 apresentou uma posição intermediária, não diferindo dos demais reprodutores ($p > 0,05$) em relação a motilidade progressiva retilínea e vigor espermático (Tabela 9).

Os resultados obtidos em relação ao volume do ejaculado são coerentes com os encontrados na literatura consultada, para bodes durante a estação reprodutiva (KARATZAS et al., 1997; SOUSA et al., 2000).

Tabela 9 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina

Bodes	Volume	Motilidade	Vigor	Turbilhonamento	Spzt 106/mL
33	0,85 ± 0,23 ^a	89 ± 6,14 ^a	3,65 ± 0,52 ^a	4,40 ± 0,65 ^a	4706 ± 812 ^a
34	0,65 ± 0,34 ^a	79,50 ± 5,98 ^b	3,10 ± 0,31 ^b	3,75 ± 0,48 ^a	2810 ± 933 ^b
40	0,63 ± 0,41 ^a	78 ± 6,32 ^b	3,10 ± 0,31 ^b	3,75 ± 0,58 ^a	2928 ± 1060 ^b
58	0,70 ± 0,27 ^a	85 ± 5,77 ^{ab}	3,55 ± 0,43 ^{ab}	4,35 ± 0,66 ^a	3377 ± 1261 ^b
<i>Geral</i>	0,7 ± 0,32	82,87 ± 7,32	3,35 ± 0,46	4,06 ± 0,662	3455 ± 1249
CV	45,87	8,84	14,01	16,29	36,15

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%. Volume = volume do ejaculado; Motilidade(%) = motilidade progressiva retilínea; Vigor = vigor espermático; Turbilhonamento = movimento em massa; Spzt 10⁶/mL = concentração espermática em milhão por mL; CV = coeficiente de variação.

Em relação aos percentuais de defeitos espermáticos não foram detectadas diferenças entre as coletas para defeitos espermáticos menores, maiores, totais e de cauda dobrada ($p > 0,05$). Entre os bodes, foram encontradas diferenças nos percentuais de defeitos espermáticos ($p < 0,05$), em que o bode 34 foi superior ao 58 ($p < 0,05$) e não diferiu dos bodes 33 e 40 ($p > 0,05$). O bode 58 apresentou os menores percentuais e desvios-padrão de defeitos espermáticos maiores, menores e totais ($p < 0,05$), mas não diferiu dos bodes 33 e 40 ($p > 0,05$) (Tabela 10). Não houve diferenças entre os bodes quanto ao percentual de caudas dobradas encontradas no sêmen *in natura* ($p > 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos morfológicos do sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina

Bodes	Maiores	Menores	Totais	Cauda
33	5,90 ± 3,11 ^{ab}	6,60 ± 5,90 ^a	12,50 ± 6,34 ^{ab}	5,30 ± 2,48 ^a
34	10,05 ± 6,00 ^a	7,20 ± 2,45 ^a	17,25 ± 7,53 ^a	6,85 ± 3,78 ^a
40	5,20 ± 3,43 ^b	6,20 ± 5,47 ^a	11,4 ± 4,73 ^{ab}	4,35 ± 3,49 ^a
58	3,90 ± 1,72 ^b	2,45 ± 2,06 ^a	6,35 ± 2,55 ^b	3,70 ± 1,49 ^a
<i>Geral</i>	6,26 ± 4,40	5,61 ± 4,56	11,87 ± 6,66	5,05 ± 3,08
CV	70,32	81,41	56,14	61,06

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%. Maiores (%) = percentagem de defeitos maiores; Menores = percentagem de defeitos menores; Totais = percentagem de defeitos totais; Cauda = defeitos de cauda encontrados na morfologia espermática; CV = coeficiente de variação.

As médias dos percentuais dos defeitos maiores, menores e totais foram inferiores àquelas encontradas por SANTOS (2001) na primavera, concordando com os achados de VINHA (1975) que observou diminuição dos defeitos espermáticos entre a primavera e outono. O animal 34 foi o único bode que iniciou o experimento em repouso sexual, havendo diminuição do percentual de defeitos totais durante o experimento ($p < 0,05$), devido os espermatozoides armazenados nos epidídimos e ampolas do ducto deferente não ejaculados serem gradualmente eliminados pela urina, e os não eliminados sofrerem gradual degeneração, aumentando o percentual de defeitos espermáticos totais nos primeiros ejaculados após um período de repouso sexual (HAFEZ, 1995) (Figura 7). Entretanto, o bode 40 apresentou decréscimo no percentual de defeitos espermáticos totais semelhante ao bode 34, e não estava em repouso sexual. Mas, o percentual esteve dentro da normalidade (21%), conforme os critérios preconizados pelo CBRA (1998), enquanto o bode 34 superou os limites preconizados pelo CBRA (1998) na primeira coleta, e já na segunda coleta estava dentro dos limites, e foi diminuindo os percentuais durante o período experimental (Figura 7). Todos os animais apresentaram-se aptos à reprodução,

conforme os critérios preconizados pelo CBRA (1998), e ejaculados de excelente qualidade e durante todo o experimento.

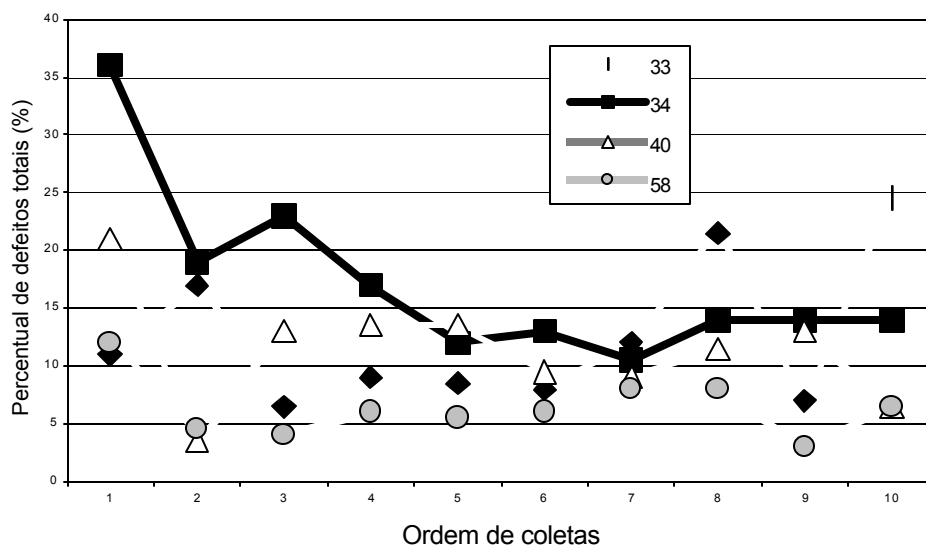


Figura 7 - Valores absolutos dos defeitos totais apresentados por cada animal da raça Parda Alpina durante os dias de coletas.

Nas análises dos testes complementares e concentração protéica total do plasma seminal não foram detectadas diferenças entre as coletas ($p > 0,05$). Assim, como no percentual de caudas dobradas no sêmen *in natura* ($p > 0,05$) (Tabela 9), os bodes não apresentaram diferenças no percentual de caudas dobradas após a incubação isoosmótica ($p > 0,05$) e hipoosmótica (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores médios e desvios-padrão dos percentuais de caudas dobradas encontradas depois da incubação de sêmen caprino nas soluções isoosmótica e hipoosmótica

Bodes	Isoosmótico	Hipoosmótico
33	10,35 ± 5,11 ^a	40,90 ± 10,06 ^a
34	8,85 ± 3,98 ^a	30,10 ± 8,27 ^a
40	9,05 ± 7,82 ^a	31,70 ± 16,97 ^a
58	7,15 ± 2,46 ^a	30,70 ± 8,31 ^a
<i>Geral</i>	8,85 ± 5,15	33,35 ± 11,89
CV	58,24	35,66

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%.

O percentual de caudas dobradas, após a incubação isoosmótica, foi superior àquele encontrado no sêmen *in natura* ($p < 0,05$), assim como no primeiro experimento. Tais observações não corroboram com os resultados de estudos que concluíram que a incubação em solução isoosmótica não altera a morfologia da cauda dos espermatozoides (RODRIGUEZ-GIL et al., 1994; CAIZA et al., 1997; VAZQUEZ et al., 1997; VAZ DE MELO, 1999). Na Figura 8, observa-se que os percentuais de caudas dobradas na incubação isoosmótica e no sêmen *in natura* foram semelhantes durante o período de coleta, mas os coeficientes de variação foram altos (58,24 e 61,06), o que pode ter influenciado os resultados do teste “t” ao detectar diferenças entre a incubação isoosmótica e defeitos de cauda dobrada no sêmen *in natura*.

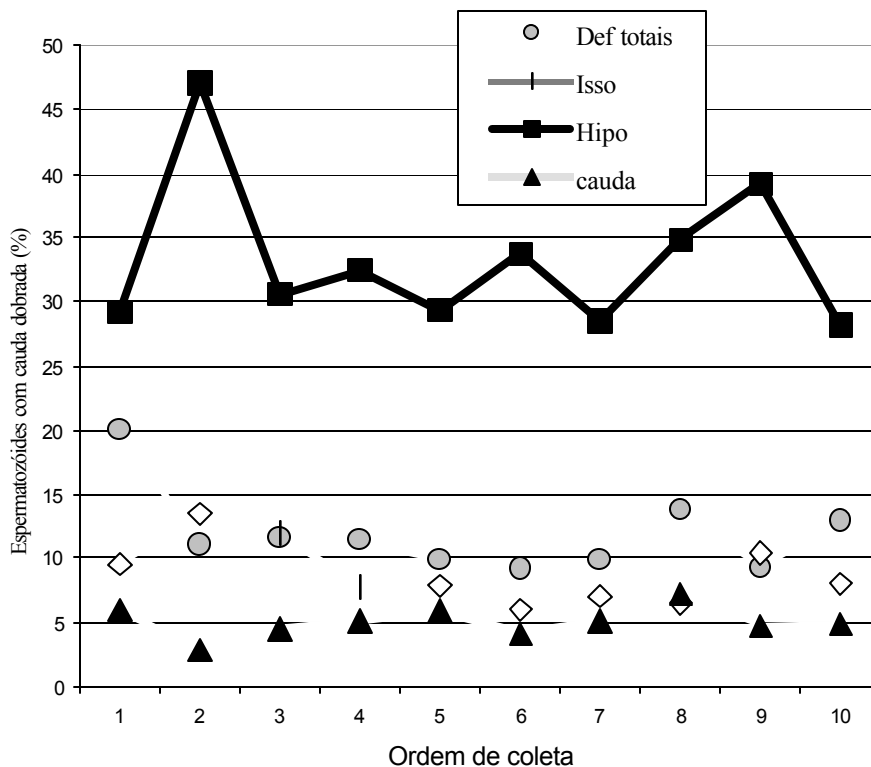


Figura 8 - Valores médios registrados nos testes isoosmótico (iso), hipoosmótico (hipo), médias dos percentuais de caudas dobradas encontradas na morfologia espermática (cauda) e defeitos espermáticos totais (def. totais) durante as coletas.

A correlação positiva encontrada entre o teste hipoosmótico e motilidade espermática progressiva retilínea foi baixa (0,28), corroborando com os achados do primeiro experimento e VAZ DE MELO (1999).

Assim como no primeiro experimento, as altas temperaturas do ambiente provavelmente influenciaram a qualidade seminal, alterando o processo de maturação epididimária e resultando em comprometimento das estruturas da membrana plasmática dos espermatozoides (HUANG et al., 2000; SANTOS, 2001) e diminuição dos dobramentos de cauda frente ao meio hipoosmótico. A média obtida neste experimento do percentual de caudas dobradas após a incubação em solução hipoosmótica (33,35%) foi maior do que a do primeiro experimento (24,58%), mas ainda foi inferior aos achados de SANTOS (2001)

durante a primavera (57,2%) devido as maiores médias e temperaturas máximas ocorrerem durante o verão (FERREIRA et al., 1998). SOUSA et al. (2000) utilizando a osmolaridade de 100mOsm/kg, também, obteve média superior no percentual de caudas dobradas na incubação hipoosmótica (84,9%). Mas, o autor utilizou um protocolo diferente do presente experimento, incubando 100ul de sêmen em 1 mL de solução hipoosmótica durante 25 minutos, e depois fixando o material em gluteraldeído a 2% para ser feito o esfregaço e contabilizados 100 espermatozóides em microscópio de contraste de fase (1000 x). O tempo de incubação de 1 hora pode aumentar a osmolaridade da solução devido à evaporação, e diminuir os dobramentos de cauda no teste hipoosmótico.

As médias da temperatura diária e umidade relativa do ar no período experimental foram 22,83°C e 80% respectivamente, e as médias do mês de março foram semelhantes. Como no primeiro experimento, as coletas de sêmen foram realizadas no turno da tarde, quando ocorrem com maiores frequências as temperaturas máximas diárias (FERREIRA et al., 1998). A média e o desvio padrão das temperaturas máximas do período experimental foram $30,16 \pm 1,59$, corroborando com os achados de FERREIRA et al. (1998) para as temperaturas na região de Viçosa, e sendo semelhantes as médias do mês de março. As temperaturas máximas e mínimas durante os dias de coleta foram menores do que as do 1.º experimento, tendo uma temperatura média também menor.

Não foi detectada diferença na concentração protéica do plasma seminal entre os dias de coleta ($p > 0,05$). O bode 33 apresentou valores inferiores na concentração protéica do plasma seminal, em relação aos demais ($p < 0,05$), não diferindo apenas do bode 34 ($p > 0,05$). Os bodes 40 e 58 apresentaram os maiores valores e não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Tabela 12).

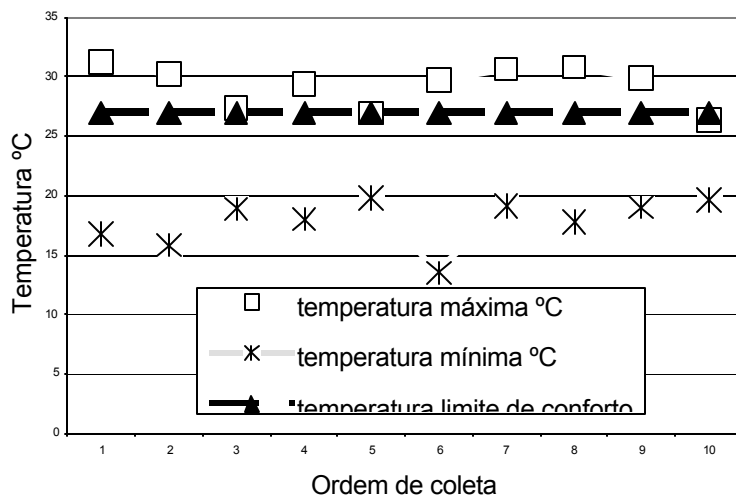


Figura 9 - Temperaturas máximas e mínimas na região de Viçosa, observadas durante os dias de coleta, comparadas com o limite de conforto térmico.

Tabela 12 - Valores médios e desvios-padrão da concentração protéica total do plasma seminal (g/dl) de sêmen de bodes adultos da raça Parda Alpina

Bodes	Proteínas seminais g/dl
33	1,67 ± 0,57 ^b
34	2,52 ± 0,91 ^{ab}
40	2,89 ± 0,92 ^a
58	3,07 ± 0,809 ^a
<i>Geral</i>	2,4 ± 0,59
CV	37,71

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%.

A média de concentração protéica total do plasma seminal encontrada neste experimento (Tabela 11) foi superior ao primeiro experimento ($p < 0,05$), mas continuou baixa em relação a literatura consultada. PINHEIRO et al. (1996b) obtiveram médias e desvios-padrão de concentração protéica total do plasma seminal de bodes da raça Parda Alpina de $4,08 \pm 0,12$, durante a estação chuvosa. SANTOS et al. (1998) também obteve médias superiores em bodes da raça Moxóto e mestiço Pardo Alpino x Moxotó de $5,14 \pm 1,09$ e $4,65 \pm 0,6$, respectivamente. Ressalta-se que PINHEIRO et al. (1996b) e SANTOS et al. (1998) utilizaram o método do biureto para determinação da concentração protéica, método com sensibilidade diferente do utilizado neste experimento, daí a dificuldade em comparar os dados deste experimento com a literatura consultada. SCOPE (1987) afirma que diferentes valores na concentração protéica são determinados em função do protocolo utilizado, e quais proteínas a solução protéica é constituída.

No total de coberturas por prenhez, não foram observadas diferenças entre os reprodutores ($p > 0,05$), porém, o bode 33 que apresentou os menores valores em concentração protéica do plasma seminal, em relação aos demais animais ($p < 0,05$) (Tabela 12), apresentou o melhor índice de prenhez (Tabela 13). É provável que o animal 33 tenha apresentado menores concentrações das transaminases, enzimas essas que são encontradas no sêmen em condições de estresse aos espermatozóides (TULI e HOLTZ, 1994), apresentando os melhores aspectos físicos do sêmen ($p < 0,05$) (Tabela 9). Supõe-se que ele adaptou-se melhor que os outros às condições ambientais e de manejo às quais o rebanho foi submetido. Uma correlação alta e negativa entre a concentração protéica total do plasma seminal e o teste hipoosmótico (0,44) foi encontrada. O animal 33 apresentou valores absolutos de caudas dobradas superiores no teste hipoosmótico (Tabela 11) e os menores valores de concentração protéica total do plasma seminal ($p < 0,05$), confirmando esta hipótese da melhor adaptação do bode 33 às condições de ambiente e de manejo impostas.

Tabela 13 - Desempenho reprodutivo de bodes da raça Parda Alpina em regime de monta controlada

Bodes	Fêmeas cobertas	Total de prenhez	Índice de prenhez
33	5	4 (80%)	1,25
34	5	2 (40%)	2,5
40	27	18 (66,66%)	1,44
58	26	18 (69,2%)	1,5

Índice de prenhez = número de fêmeas cobertas pelo número de fêmeas gestantes durante a estação.

Ressalta-se que o número de fêmeas cobertas por bode foi diferente (Tabela 13) em função da estratégia de cruzamento empregado no manejo do rebanho estudado, sendo estipulado de acordo com os critérios do capril (pedigree e progênie dos animais). A análise tornou-se difícil em função do pequeno número amostral.

Além das dificuldades para analisar, estatisticamente, os dados de cobertura e gestação, a estimulação das glândulas sexuais secundárias desses animais no momento da cópula (HAFEZ, 1995) pode ter sido um fator importante no perfil da proteína do plasma seminal, devido à sua influência no funcionamento do aparelho reprodutor masculino.

A análise de concentração das proteínas solúveis do plasma seminal, realizadas neste estudo, não apresentou relação com a fertilidade dos machos. A concentração protéica total do plasma seminal não é suficiente para predizer a qualidade seminal de reprodutores, devido à existência de várias substâncias protéicas que se encontram no plasma seminal com diversas funções no metabolismo espermático. A identificação, caracterização e quantificação dessas moléculas têm grande importância no estudo da fertilidade dos reprodutores, e a técnica empregada neste experimento para quantificar as proteínas totais é

utilizada para estimar a concentração das diversas proteínas solúveis identificadas no sêmen de reprodutores.

4. CONCLUSÃO

O teste hipoosmótico pode ser uma importante ferramenta para avaliação de sêmen caprino, visto a relação com a motilidade espermática progressiva retilínea, uma das principais características físicas do sêmen de reprodutores.

Neste estudo, a concentração protéica total do plasma seminal não se relacionou com a fertilidade dos animais em regime de monta controlada, nem com as características físicas e morfológicas do sêmen e teste hipoosmótico.

3. CONCLUSÕES GERAIS

O teste hipoosmótico é uma importante ferramenta para prever a qualidade seminal, visto a correlação alta com os resultados obtidos no teste de termorresistência.

Neste estudo, a determinação da concentração das proteínas solúveis do plasma seminal não relacionou-se com a qualidade seminal, teste hipoosmótico, teste de termorresistência e fertilidade de machos caprinos em regime de monta controlada, sendo que este estudo não foi hábil em prever o potencial reprodutivo dos bodes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M., KHAN, A., SHAH, Z.A., AHMAD, K.M. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. **An. Reprod. Scie.**, v. 41, p. 193-199, 1996.
- AHMED, A.M.M., BELELY, E.M.S., ISMAIL, S.T., BAGHDADY, E., HEMEIDA, N.A. Influence of age and season on certain biochemical constituents of seminal plasma of Arabian horses. **An. Reprod. Scie.**, v. 32, p. 237-244, 1993.
- AL SOMAI, N., VISHWANATH, N., SHANNON, P.E., MOLAN, P.C. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. **J. Reprod. Fert.**, v. 6, p. 165-171, 1994a.
- AL SOMAI, N., VISHWANATH, R., SHANNON, R., MOLAN, P.C. Low molecular weight components in bovine diffusate and their effects on motility of bull sperm. **Reprod Fertil. Dev.**, v. 41, p. 193-199, 1994b.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M. et al. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 1294.
- BAAS, W.J., MOLAN, P.C., SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v. 68, p. 275-280, 1983.
- BARNABE, V.H., BARNABE, R.C., VISITIN, J.A. Estudo comparativo entre as provas rápidas e lenta de termo resistência para avaliação de sêmen congelado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 4, n. 3/4, p. 7-11, 1981.

- BARTH, A.D., OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** Ames, Iowa: Iowa State University, 1989. p. 285.
- BELLIN, E., HAWKINS, E., OYARZO, N., VANDERBOOM, J., AX, L. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **J. Anim. Science**, v. 74, p. 173-182, 1996.
- BELLIN, E., OYARZO, N., HAWKINS, E. et al. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **J. Anim. Science**, v. 76, p. 2032-2039, 1998.
- BETSY, P., OLDS-CLARKE, P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. **Biol. Reprod.**, v. 35, p. 608-617, 1986.
- BLOMM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. **Nordisk Veterinärer Medicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **An. Bioch.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDON, C.I., HEUSNER, G.L., CAUDLE, A.B., FAYRER-HOSKEN, R.A. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriog.**, v. 52, p. 863-873, 1999.
- BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento.** Viçosa: UFV, 2000. 92 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- CAIZA, C.F.I., RIGAU, T., BONET, S., MIRÓ, J. et al. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. **Theriog.**, v. 47, p. 765-784, 1997.
- CHEN, W.S.O., CHOW, H.E.P.H. Effects of male accessory sex gland secretions on early embryonic development in the golden hamster. **J. Reprod. Fert.**, v. 84, p. 341-344, 1988.
- COHEN, P., PEEHL, M., GRAVES, H.C.B., ROSENFELD, R.C. Biological effects of protate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. **J. Endocrinology**, v. 42, p. 407-415, 1994.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

CORREA, J.R., ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriog.**, v. 42, p. 351-360, 1994.

CORREA, J.R., PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriog.**, v. 48, p. 721-731, 1997.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol Reprod.**, v. 59, p. 7-11, 1998.

CURTIS, S.E. **Environmental management in animal agriculture**. Ames: ISUP, 1983. 410 p.

CURY, J.L., VINHA, N.A. Alterações na morfologia do espermatozóide durante sua passagem pelo epidídimo de caprinos. **Arq. Esc. Vet.**, Belo Horizonte, v. 34, p. 267-271, 1982.

DACHEUX, J.L., PAQUIGNON, M., COMBARNOUS, Y. Head-to-head agglutination of ram and boar epididymal spermatozoa and evidence for an epididymal antagglutinin. **J. Reprod. Fert.**, v. 67, p. 181-189, 1983.

DESNOYERS, L., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insuline-like growth factor-II. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 5776-5780, 1994.

DREVIUS, L.O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **J. Reprod. Fert.**, v. 28, p. 41-54, 1972.

FAHMI, H.A., HUNTER, A.G., MARKHAM, J.F.B., SEGUIN, E. Identification of an immunosuppressive protein in bovine seminal plasma with activity against bovine lymphocytes. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 2322-2328, 1985a.

FAHMI, H.A., HUNTER, A.G., MARKHAM, J.F.B., SEGUIN, E. Immunosuppressive activity of bovine seminal plasma on bovine lymphocytes *in vitro*. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 2315-2321, 1985b.

- FERREIRA, W.P.M., SOUSA, C.F., ARAÚJO, H.B. Comportamento das temperaturas extremas de Viçosa-MG. **Atmosfera e Água**, Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento, v. 3, p. 27-32, 1998.
- FONSECA, J.F., TORRES, C.A.A., SANTOS, A.D.F., ROVAY, H. et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, p. 436-438, 2001.
- FRASER, L., AJULIA, K.K. Metabolic and surface events in fertilization. **Gamete Res.**, v. 20, p. 491-519, 1988.
- GADELLA, M.B., COLENBRANDER, B., CARDOZO, L. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 381-386, 1991.
- GUIMARÃES, J.D. **Comunicação pessoal**. 2001.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 146-156.
- HANCOCH, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **J. Roy. Microsc. Soc.**, v. 76, p. 84-97, 1957.
- HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J., KAVANAUGH, J.F., GRIEL, J.R. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 390-397, 1995.
- HENRICKS, D.M., KOUBA, A., LACKEY, B.R., BOONE, W.R., GRAY, S.L. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 330-337, 1998.
- HINTON, B.T., PALLADINO, M.A., RUDOLPH, D., LABUS, C.J. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 731-745, 1995.
- HOEFLICH, A., REICHENBACH, H.D., SCHWARTZ, J., GRUPP, T. et al. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. **Domest. Anim. Endocrinology**, v. 17, p. 39-51, 1999.
- HOWARD, B., ACOTT, T.S., JOHNSON, D.J., HOSKINS, D.D. Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. **Biol. Reprod.**, v. 19, p. 830-835, 1978.

- HUANG, S.Y., KUO, Y.H., LEE, Y.P., TSOU, H.L., LIN, E.C., JU, C.C., LEE, W.C. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 231-240, 2000.
- HUNTER, A.G., HAFS, H.D. Antigenicity and cross reactions of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v. 7, p. 357, 1964.
- JAIN, Y.C., ANAND, S.R. Phospholipids of goat spermatozoa and the seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v. 12, p. 393-395, 1975.
- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M., GRABO, B.G., ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fert.**, v. 70, p. 219-225, 1984.
- KARATZAS, G., KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., BRIKAS, P. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriog.**, v. 48, p. 1049-1059, 1997.
- KASTELIC, J.P., COOK, R.B., COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, p. 255-261, 1997.
- KATSKA, L., RYNSKA, B., SMORAG, Z. Effect of seminal plasma on the *in vitro* fertilizability of bull spermatozoa. **An. Reprod. Scie**, v. 44, p. 23-31, 1996.
- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- KYSILKA, C. Haemolytic factor from bull seminal vesicle fluid: isolation and some properties. **J. Reprod. Fert.**, v. 32, p. 185-192, 1973.
- LENA, M. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriog.**, v. 48, p. 523-530, 1997.
- LUKAC, J., PRIBANIC, M., KOREN, E. Calcium-binding protein in Bull seminal vesicle secretion and seminal plasma. **J. Reprod. Fert.**, v. 48, p. 77-81, 1976.
- MANJUNATH, P., CHANDONNET, L., LEBLOND, E., DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 27-37, 1993.

- MANJUNATH, P., SOUBEYRAND, S., CHANDONNET, L., ROBERTS, D. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A₂. **Biochem. J.**, v. 49, p. 121-128, 1994.
- MATOUSEK, J., KLAUDY, J. Qualitative and quantitative analyses of seminal ribonuclease in reproductive tract fluids of bulls. **An. Reprod. Scie**, v. 51, p. 111-118, 1998.
- MAXWELL, W.M.C., JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. **Theriog.**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.
- MAXWELL, W.M.C., EVANS, G., MORTIMER, S.T., GILLIAN, L. et al. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 11, p. 123-126, 1999.
- MENDONZA, G., WHITE, G.I., CHOW, P. Studies of chemical components of angora goat seminal plasma. **Theriog.**, v. 32, p. 455-466, 1989.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. v. 2, p. 781.
- MINTON, J.E. Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. **J. Anim. Science**, v. 72, p. 1891-1898, 1994.
- MOREIRA, J.N., GUIMARÃES FILHO, C., ARAÚJO, G.G.L., SILVA, A.K.N. Desempenho reprodutivo de caprinos criados na caatinga e suplementados no período seco no sertão de Pernambuco. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 37, 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000. p. 1-3.
- NAGY, S., HÁZAS, G., BALI, P.A. et al. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. **Theriog.**, v. 52, p. 1153-1159, 1999.
- NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriog.**, v. 51, p. 721-727, 1999.
- NUNES, J.F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. EMBRAPA, 1982. (Circular Técnica, 5).
- PANGAWKAR, G.R., SHARMA, R.D., SHARMA, R. Phosphatase and transaminase activity in the seminal plasma of bulls in relation to freezability of sêmen. **Theriog.**, v. 29, p. 1393-1399, 1988.

- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., UGUZ, C., FIRST, N.L. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 1099-1108, 1994.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., GRAHAM, J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriog.**, v. 51, p. 461-472, 1999.
- PELLICER-RUBIO, M.T., COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **J. Reprod. Fert.**, n. 112, p. 95-105, 1998.
- 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. **J. Reprod. Fert.**, v. 57, p. 1023-1031, 1997.
- PINHEIRO, R.R., MACHADO, 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 SBZ, 33, 1996, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 1996a. p. 419-421.
- PINHEIRO, R.R., MACHADO, R., PINHEIRO, A.A., SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros bioquímicos do plasma seminal de três tipos raciais de caprinos do nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 33, 1996, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 1996b. p. 416-418.
- QUEEN, K., DHABUWALA, C.B., PIERREPOINT, C.G. The effect of the removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. **J. Reprod. Fert.**, v. 62, p. 423-426, 1981.
- REVELL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **An. Reprod. Scie.**, v. 36, p. 77-86, 1994.
- RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos.** São Paulo: Nobel, 1997. 318 p.
- RITAR, A.J. Seasonal changes in LH, androgens and testes in the male Angorá goat. **Theriog.**, v. 36, p. 959-970, 1991.
- RIVIER, C., RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the Hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 523-532, 1991.

- RODRIGUEZ-GIL, J.E., MONTSERRAT, A., RIGAU, T. Effects of hipoosmotic incubation on acrossome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriog.**, v. 42, p. 815-829, 1994.
- ROTA, A., PENZO, N., VICENTI, L., MANTOVANI, R. Hipoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriog.**, v. 53, p. 1415-1420, 1999.
- SANTOS, A. **Características reprodutivas e congelabilidade do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo**. Viçosa: UFV, 2001. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SANTOS, D.O., AZEVEDO, H.C., SALLES, H.O., PINHEIRO, R.R. Efeito da insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de bodes. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v. 50, p. 283-286, 1998.
- SCOPE, R.R. **Protein purification: principles and practice**. 2.ed. 1987. p. 276-283.
- SHANNON, P. Presence of a heat-labile toxic protein in bovine seminal plasma. **J. Dairy Sci.**, v. 48, p. 1362-1365, 1965.
- SHONECK, C., BRAUN, J., EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriog.**, v. 45, p. 633-642, 1996.
- SIMPLÍCIO, A.A., MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1989, Belo Horizonte. **Palestras...** Belo Horizonte, 1989. p. 171-177.
- SINHA, M.P., SINHA, A.K., SINGH, B.K., PRASAD, R.L. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat sêmen. **An. Reprod. Scie.**, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SINSINTHY, S., BHARGAVA, P.M., SCHEIT, K.H. Immunological identification of seminalplasmin in tissue extract of sex glands of bull. **Biol. Reprod.**, v. 30, p. 1237-1241, 1984.
- SOUSA, J.P.F., BARBAS, J.P., FERREIRA, G.M.B.C., HORTA, A.E.M. Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA "PROGRESSOS ZOOTÉCNICOS NOS PAÍSES DE LÍNGUA PORTUGUESA", 10, 2000, Vale de Santarém. **Anais...** Vale de Santarém, 2000. p. 87.

- SUNDHEY, R., AHUJA, S.P., SINGH, B. Changes in the membrane proteins of buck (*Capra hircus*) spermatozoa during epididymal maturation. **Small Rum. Research**, v. 16, p. 251-261, 1995.
- THERIEN, I., BLEAU, G., MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 1372-1379, 1995.
- THERIEN, I., SOUBEYRAND, S., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1080-1088, 1997.
- THERIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 590-598, 1999.
- TULI, R.K., HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from boer goat spermatozoa. **Theriog.**, v. 42, p. 547-555, 1994.
- UGUZ, C., VREDENBURGH, W.L., PARRISH, J.J. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphothioate. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 1031-1039, 1994.
- UPRETI, G.C., PAYNE, S.R., DUGANZICH, D.M., OLIVER, J.E., SMITH, J.F. Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. **An. Reprod. Scie.**, v. 41, p. 27-36, 1996.
- UPRETI, G.C., HALL, E.L., KOPPENS, D., OLIVER, J.E., VISHWANATH, E. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. **An. Reprod. Scie.**, V. 56, p. 107-121, 1999.
- VAZ DE MELO, M.I. **Teste hipoosmótico na avaliação do sêmen eqüino.** Belo Horizonte: UFMG, 1999. 130 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.
- VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., MARTINEZ, P., GARCIA-ARTIGA, C., ROCA, J. Hipoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriog.**, v. 47, p. 913-922, 1997.
- VINHA, N.A. Variação estacional na produção e qualidade do sêmen de *capra hircus* (seasonal variation in the production and quality of goat sêmen). **Arq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v. 27, p. 23-28, 1975.

VISCONTI, P.E., KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1-6, 1998.

YANAGINACHI, R. **Mammalian fertilization: the physiology of reproduction**. New York: Raven, 1994. p. 189-317.