

JURANDY MAURO PENITENTE FILHO

**ADIÇÃO DA VITAMINA E NA CRIOPRESERVAÇÃO
DO SÊMEN CAPRINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

JURANDY MAURO PENITENTE FILHO

**ADIÇÃO DA VITAMINA E NA CRIOPRESERVAÇÃO
DO SÊMEN CAPRINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de julho de 2010.

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Co-orientador)

Prof. Antônio Bento Mâncio
(Co-orientador)

Prof. José Domingues Guimarães

Profª. Margarida Maria Nascimento
Figueiredo de Oliveira

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.” (Louis Pasteur)

*Dedico esta obra a minha família, minha mãe **Sirley Bongiovani Penitente**, meu pai **Jurandy Mauro Penitente**, minhas irmãs **Scheila Penitente Novelli** e **Shirley Aparecida Penitente**, e aos meus sobrinhos **João Victor Penitente Usbert**, **Tainá Novelli** e **Amanda Novelli**.*

Aos meus amigos de Viçosa, a minha segunda família.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Ser Supremo, pelo dom da vida e, estando sempre presente em minha vida, agraciou-me com paciência, força e sabedoria, ajudando-me a superar toda e qualquer dificuldade que se antepôs ao meu caminho durante a realização deste trabalho. Graças a Ele posso afirmar que superei mais uma etapa da minha vida. Obrigado.

Aos meus pais, Jurandy Mauro Penitente e Sirley Bongiovani Penitente, por simplesmente tudo, a vida, a oportunidade de estudar longe de casa, ao apoio financeiro, e principalmente ao apoio moral, nos momentos mais complicados vocês estiveram ao meu lado me dando força e coragem para superar os obstáculos. Obrigado.

Às minhas irmãs, Scheila Penitente Novelli e Shirley Aparecida Penitente, por também estarem sempre ao meu lado nos momentos difíceis. Obrigado.

Aos meus queridos amigos, minha família de Viçosa, Alberto, João, Marcus, Bruna (que já me salvou aqui!), Júlio César, Fabrício, Pablo. Obrigado por todos os momentos de grande alegria que vocês me proporcionaram, as conversas, as risadas e também os ombros amigos. Obrigado gente.

A Madriano, Giselle, Vívian, Rogério, Leonardo e João pelo auxílio durante o experimento. Obrigado.

Ao meu orientador, Ciro Alexandre Alves Torres, pela paciência, amizade e conselhos durante o mestrado e por acreditar que eu era capaz de assumir a responsabilidade de conduzir um projeto de mestrado num dos melhores programas de pós-graduação do país. Obrigado.

Ao professor Antonio Bento Mancio, por ter aceitado me orientar possibilitando o meu ingresso no programa de pós-graduação. Obrigado.

Ao professor José Domingos Guimarães, pelos conhecimentos e pela disponibilidade em sempre me ajudar com as minhas dificuldades durante a realização do projeto. Obrigado.

Ao professor Cláudio Borela Espescht, pela ajuda e pelos conselhos durante o experimento. Obrigado.

Ao Departamento de Zootecnia, ao professor Marcelo e aos funcionários do Setor de Caprinocultura. Obrigado.

BIOGRAFIA

Jurandy Mauro Penitente Filho, filho de Jurandy Mauro Penitente e Sirley Bongiovani Penitente, nasceu em Colatina-ES em 09 de setembro de 1985 e residiu em Santa Teresa-ES até seus 17 anos.

Em 2003 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, graduando-se em janeiro de 2008.

Em agosto de 2008 ingressou no programa de pós-graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, na área de Reprodução Animal, tendo apresentado sua dissertação de Mestrado em julho de 2010.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS..... | vii |
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1 – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 – REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 – Estrutura dos Espermatozóides..... | 3 |
| 2.2 – Componentes da membrana espermática..... | 4 |
| 2.3 – Capacitação e Reação Acrossomal..... | 5 |
| 2.4 – Criopreservação do sêmen caprino..... | 6 |
| 2.4.1 – <i>Diluentes</i> | 7 |
| 2.4.2 – <i>Crioprotetores</i> | 8 |
| 2.5 – Radicais Livres..... | 9 |
| 2.6 – Vitamina E..... | 10 |
| 2.7 – Equex (Orvus es Paste)..... | 11 |
| 2.8 – Teste Hiposmótico (HOST)..... | 12 |
| 2.9 – Teste de Termorresistência (TTR)..... | 14 |
| 3 – MATERIAL E MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1 – Animais, alimentação e sanidade..... | 15 |
| 3.2 – Avaliação física e morfológica do sêmen..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 3.3 – Preparo das soluções estoque de Vitamina E..... | 17 |
| 3.4 – Diluição, Resfriamento, Congelamento e Descongelamento do sêmen..... | 17 |
| 3.5 – Teste de Termorresistência (TTR)..... | 19 |
| 3.6 – Teste Hiposmótico..... | 19 |
| 3.7 – Análise estatística..... | 20 |
| 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 21 |
| 4.1 – Sêmen fresco..... | 21 |
| 4.2 – Sêmen Descongelado..... | 24 |
| 5 – CONCLUSÕES..... | 31 |
| 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01 – Composição química do diluente base (BIOXCELL [®])..... | 18 |
| Tabela 02 – Composição dos diluentes de cada tratamento..... | 18 |
| Tabela 03 – Características físicas do sêmen fresco de bodes da raça Parda Alpina criados em manejo intensivo (Média ± erro-padrão)..... | 21 |
| Tabela 04 – Motilidade progressiva, vigor espermático e teste hiposmótico do sêmen fresco de bodes da raça Parda Alpina criados em manejo intensivo (Média ± erro-padrão)..... | 21 |
| Tabela 05 – Características morfológicas do sêmen fresco de bodes Pardo alpinos adultos, criados em manejo intensivo (Média ± erro-padrão)..... | 22 |
| Tabela 06 – Correlações simples de Pearson entre as características físicas e morfológicas e teste hiposmótico do sêmen fresco de bodes Pardo alpinos adultos, criados em manejo intensivo..... | 23 |
| Tabela 07 – Motilidade progressiva no teste de termorresistência de sêmen caprino diluído em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão)..... | 25 |
| Tabela 08 – Vigor espermático no teste de termorresistência de sêmen caprino diluído em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão)..... | 26 |
| Tabela 09 – Percentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico do sêmen caprino diluído em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão)..... | 26 |
| Tabela 10 – Correlações Simples de Pearson entre a motilidade progressiva e o vigor espermático do teste de termorresistência e o teste hiposmótico para cada tratamento..... | 28 |

| | |
|---|----|
| Tabela 11 – Características morfológicas (defeitos menores, defeitos maiores, defeitos totais e espermatozóides normais) do sêmen descongelado (Média ± Erro-padrão)..... | 29 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01 – Estrutura química da Vitamina E..... | 10 |
| Figura 02 – Vagina Artificial para coleta de sêmen (Modelo Artesanal)..... | 16 |

RESUMO

PENITENTE FILHO, Jurandy Mauro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Adição da vitamina E na criopreservação do sêmen caprino.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-orientadores: Giovani Ribeiro de Carvalho e Antônio Bento Mâncio.

O objetivo deste estudo foi verificar se a vitamina E afeta a integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozóides caprinos, bem como verificar o potencial uso desta vitamina em meios diluentes de criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados 2 machos adultos da raça Parda alpina. Para as coletas de sêmen foi utilizada vagina artificial onde se obteve 8 ejaculados por animal. Após a coleta, fez-se a avaliação física do sêmen, morfológica dos espermatozóides e da integridade funcional da membrana espermática pelo teste hiposmótico. Em seguida, o sêmen foi diluído com os seguintes tratamentos: BIOXCELL[®] (Controle), BIOXCELL[®] + Equex, BIOXCELL[®] + Vitamina E 25 μ M, BIOXCELL[®] + Vitamina E 50 μ M e BIOXCELL[®] + Vitamina E 100 μ M. Após as diluições finais, foram avaliados a motilidade progressiva e vigor espermático e realizado teste hiposmótico de cada tratamento. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, as palhetas foram resfriadas a 5 °C, durante 1 hora em refil plástico contendo álcool etílico. O pré-congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido durante 15 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento final do sêmen. As partidas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em tubos plásticos e homogeneizadas para a análise imediata de motilidade e vigor espermático, teste hiposmótico e teste de termorresistência. No sêmen fresco, as características físicas e morfológicas mantiveram-se dentro de parâmetros normais. Não houve correlação da motilidade progressiva com outras variáveis. O volume apresentou correlação negativa com o vigor espermático, defeitos menores e defeitos totais ($r = -0,55$, $r = -0,52$ e $r = -0,53$, respectivamente) e correlação positiva com o teste hiposmótico ($r = 0,44$). Houve correlação média negativa ($r = -0,48$) entre a concentração de espermatozóides e os defeitos maiores. Os valores de defeitos menores e defeitos totais apresentaram correlação forte e positiva ($r = 0,98$). A motilidade progressiva, o vigor espermático e o teste hiposmótico do sêmen diluído não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$). As médias gerais de motilidade e vigor logo após o descongelamento e ao longo do TTR não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A integridade funcional da membrana

espermática, avaliada pelo teste hiposmótico, não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Foi observada correlação positiva entre motilidade e vigor dos espermatozóides em todos os tratamentos no sêmen diluído (pré-resfriado) e em todos os tempos do TTR. Não houve correlação entre o vigor e o teste hiposmótico dos espermatozóides em nenhum dos tratamentos no sêmen diluído e nos tempos 0H e 2H do TTR, havendo correlação média positiva no tratamento Equex no tempo 1H ($r = 0,51$) e nos tratamentos Controle, Equex e Vit. E 50 μ M no tempo 3H ($r = 0,44, 0,69, 0,57$, respectivamente). Houve correlação entre a motilidade e o teste hiposmótico do sêmen diluído no Tratamento Vit. E 50 μ M ($r = 0,68$). As amostras de sêmen dos tratamentos Equex e Vit. E 100 μ M descongeladas mostraram correlações entre motilidade e teste hiposmótico. Conclui-se que: Nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo foi afetado pela Vitamina E.

ABSTRACT

PENITENTE FILHO, Jurandy Mauro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Vitamin E on cryopreservation of goat semen.** Advisor: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-advisors: Giovani Ribeiro de Carvalho and Antônio Bento Mâncio.

The objectives of this study were to examine whether vitamin E has an effect on the structural integrity of goat sperm plasma membrane, as well to investigate the potential use of this vitamin in extenders medium for cryopreservation of goat semen. Two adult Parda Alpina breed males were used, totalizing 8 semen samples for each one. After collection, the physical characteristics of the semen, the sperm morphology and the functional integrity of sperm membrane by hypoosmotic swelling test were evaluated. Then the semen was diluted as follows: BIOXCELL[®] (Control), BIOXCELL[®] + Equex, BIOXCELL[®] + Vitamin E (25 μ M), BIOXCELL[®] + Vitamin E (50 μ M) and BIOXCELL[®] + Vitamin E (100 μ M). After the final dilutions, the progressive motility, sperm vigor and hypoosmotic swelling test were performed for each treatment. The semen was packaged in 0.25 ml straws, the straws were cooled to 5 °C for 1 hour in plastic container containing ethyl alcohol. The pre-freezing was done in liquid nitrogen vapor for 15 minutes. After this period, the straws were immersed in liquid nitrogen. The samples were thawed in a water bath at 37 °C for 30 seconds, packaged in plastic tubes and homogenized for immediate analysis of sperm motility and vigor, hypoosmotic swelling test and thermoresistance test. In fresh semen, the physical and morphological characteristics remained within normal parameters. No correlation of motility with other variables were detected. The average volume correlated negatively with sperm vigor, minor defects and total defects ($r = -0.55$, $r = -0.52$ and $r = -0.53$, respectively) and positive correlation with the hypoosmotic swelling test ($r = 0, 44$). A negative correlation ($r = -0.48$) was found between sperm concentration and major defects. The minor defects and total defects values were markedly positive correlated ($r = 0.98$). The treatments did not differ ($P > 0.05$) for progressive motility, spermatoc vigor and hypoosmotic swelling test of semen. The motility and vigor after thawing and during the TTR did not differ ($P > 0.05$) among treatments. No significant difference ($P > 0.05$) among treatments after the completion of the hypoosmotic swelling test was detected. Correlation was observed between motility and vigor in all treatments in the diluted semen (pre-cooled) and at all times of

the TTR. No correlation between the vigor and the hypoosmotic swelling test in any of the treatments on 0H and 2H of TTR times was found, however a correlation at 1H time Equex treatment ($r = 0.51$) and the Control, Equex and Vit. E 50 μ M treatment at time 3H ($r = 0.44, 0.69, 0.57$, respectively) were found. The thawed semen samples from Equex treatment and Vit. E 100 μ M treatment showed correlation between motility and hypoosmotic swelling test. It is concluded that: The vitamin E did not affect any of parameters under study.

1 – INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial e a transferência de embriões foram introduzidas na caprinocultura com os objetivos principais de acelerar o ganho genético de animais superiores e de aumentar a eficiência reprodutiva (SMITH, 1986).

A inseminação artificial apresenta como vantagens: o melhoramento do rebanho em menor tempo por meio da utilização de sêmen de reprodutores provados para a produção de leite e carne; o controle de doenças que poderiam ser transmitidas às cabras pela monta natural; a utilização de bodes com problemas adquiridos e impossibilitados de efetuarem a monta; a obtenção de maior número de descendentes de um reprodutor; a padronização do rebanho; o nascimento de filhos após a morte do pai, em face da possibilidade de congelamento e estocagem do sêmen; entre outras (CASTILHO, 2008).

O sêmen de boa qualidade é um dos fatores de fundamental importância para o sucesso da Inseminação Artificial, por isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição dos espermatozóides viáveis por dose, sendo assim, ao diminuir ou cessar qualquer tipo de injúria que os comprometam, haverá a possibilidade de diminuir a concentração espermática por dose de sêmen congelado, além do aumento do retorno econômico tanto para os produtores como para as Centrais de Inseminação Artificial (CASTILHO, 2008).

A Inseminação Artificial é uma técnica altamente recomendada para o manejo reprodutivo de caprinos, logo, pesquisas envolvendo criopreservação de espermatozóides continuam sendo necessárias com o intuito de cada vez mais aperfeiçoar meios diluentes e incrementar os programas de Inseminação Artificial (SALVIANO & SOUZA, 2008).

Adicionalmente, o estresse oxidativo é um fator associado com a diminuição da fertilidade durante a estocagem do sêmen. A geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) é consequência normal do metabolismo oxidativo, e parece estar envolvida nos danos dos espermatozóides em condições hipotérmicas de estocagem (MAXWELL & WATSON, 1996). O excesso de reação oxidativa possui efeito destrutivo na membrana espermática e no DNA dos espermatozóides. A membrana espermática é rica em ácidos

graxos poliinsaturados (ZALATA & DEPUYDT, 1998), os quais, em condições hipotérmicas, se tornam altamente sensíveis a espécies reativas de oxigênio.

Além dos espermatozóides caprinos sofrerem facilmente peroxidação quando comparados com os espermatozóides de bovinos, o sêmen congelado e descongelado é mais susceptível a peroxidação lipídica do que o sêmen fresco (BILODEAU et al., 2000). Nesse contexto, os antioxidantes surgem como potenciais constituintes alternativos para crioprotetores no processo de congelamento de sêmen de caprinos.

A Vitamina E é considerada um componente primário do sistema antioxidante do espermatozóide (SURAI et al., 1998), e é um dos principais protetores de membrana contra ROS (AKIYAMA, 1999). Alguns estudos mostraram melhorias na quantidade e qualidade do esperma com suplemento de Vitaminas C e E (YOUSEF et al., 2003).

O objetivo deste estudo é verificar se a vitamina E contém efeito sobre a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides caprinos, bem como verificar o potencial uso desta vitamina em meios diluentes de criopreservação de sêmen caprino.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Estrutura dos Espermatozóides

O espermatozóide é o produto final do processo espermatogênico, que ocorre em fases sucessivas, mitóticas, meióticas e pós-meióticas, dentro dos túbulos seminíferos do testículo. Durante a fase mitótica, a progênie de células germinativas submete-se a uma série de divisões para expandir a população espermatogonial. A fase meiótica inicia-se com a última fase S do ciclo celular e culmina em duas divisões meióticas que ocorrem rapidamente sem replicação de DNA produzindo espermátides haplóides. Enquanto estas duas fases são essenciais para o desenvolvimento do gameta masculino, é durante a fase pós-meiótica que o espermatozóide ganha forma. Esta fase é caracterizada pelo extensivo remodelamento das espermátides, com a formação do acrossoma, condensação nuclear, desenvolvimento do flagelo e perda da maior parte do citoplasma. Estes eventos resultam em uma célula altamente diferenciada em estrutura e função, capaz de combinar-se com o ovócito para iniciar o processo de uma nova geração (KNOBIL & NEILL, 2006).

Os principais componentes de um espermatozóide são a cabeça e a cauda, ligados por uma peça de conexão chamada colo. A cabeça contém o núcleo, o acrossoma, estruturas do citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma. O núcleo possui uma cromatina altamente condensada e está recoberto em sua parte anterior pelo acrossoma, que é uma vesícula revestida por membrana contendo enzimas hidrolíticas (KNOBIL & NEILL, 2006).

A cauda do espermatozóide é composta de colo e peças intermediária, principal e terminal. A região da cauda entre o colo e o *annulus* é a peça intermediária. A parte central desta peça, junto com o comprimento total da cauda, forma o axonema. O axonema é composto de nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais. Na peça intermediária, esse padrão 9 + 2 de microtúbulos estão circundados por nove densas fibras. O seu axonema e as fibras associadas são recobertos periféricamente por numerosas mitocôndrias, esta bainha mitocondrial fornece a energia para a motilidade espermática (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A peça principal, que se estende do *annulus* até a parte terminal da cauda, é composta centralmente pelo axonema e sua associação de fibras densas. A peça terminal contém apenas o axonema central que está recoberto pela membrana plasmática. O

axonema é responsável pela motilidade espermática e os pares de microtúbulos de padrão 9 + 2 geram as ondas da cauda por meio de deslizamento entre os pares adjacentes (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.2 – Componentes da membrana espermática

As membranas biológicas são impermeáveis à maioria dos solutos polares, mas permeáveis a substâncias apolares, possuem de 5 a 8 nm de espessura e parecem trilaminares quando vistas em secção transversal na microscopia eletrônica. As evidências combinadas da microscopia eletrônica e de estudos da composição química, bem como estudos físicos da permeabilidade e movimentos de moléculas individuais de proteínas e lipídios dentro da membrana, levaram ao desenvolvimento do modelo de mosaico fluído para a estrutura das membranas biológicas (LEHNINGER et al., 2005).

Os fosfolipídios das membranas formam uma bicamada em que as regiões não-polares das moléculas lipídicas de cada camada interagem entre si na parte interior da bicamada, as regiões polares, por sua vez, interagem com a fase aquosa, na face externa. As proteínas estão embebidas nesta bicamada seguras por interações hidrofóbicas entre os lipídios da membrana e os domínios hidrofóbicos das proteínas (LEHNINGER et al., 2005).

Os lipídios e proteínas das membranas formam um mosaico fluído com um padrão que é livre para mudar constantemente, a maioria das interações entre os componentes da membrana é não-covalente, deixando lipídios individuais e moléculas de proteínas livres para se moverem lateralmente no plano da membrana (LEHNINGER et al., 2005).

Uma característica importante da membrana espermática é a sua subdivisão em regiões que diferem em composição e função. O conhecimento de que a organização e composição da membrana espermática variam entre diferentes regiões da membrana levou ao conceito de que a membrana plasmática do espermatozóide é um mosaico de domínios restritos, o que reflete as funções especializadas dos componentes da membrana do espermatozóide (KNOBIL & NEILL, 2006).

As principais regiões da membrana espermática da cabeça do espermatozóide da maioria dos mamíferos são a região acrossomal e a região pós-acrossomal. A região acrossomal pode também ser subdividida em: segmento apical, segmento principal e segmento equatorial. O tamanho e forma desses segmentos variam conforme a espécie. A região pós-acrossomal inclui a membrana plasmática entre a margem posterior do

acrossoma e o colo. Em algumas espécies, a margem entre as regiões acrossomal e pós-acrossomal é delimitada pelo anel subacrossomal (KNOBIL & NEILL, 2006).

A membrana plasmática da cauda é dividida em domínio da peça intermediária, domínio da peça principal e domínio da peça distal. Os domínios das peças intermediária e principal são separados pelo *annulus*. A maior parte destes domínios da membrana espermática é estabelecida durante a espermiogênese, contudo, os espermatozoides sofrem mudanças na membrana durante a maturação no epidídimo e alguns domínios adquirem sua forma e composição final após a espermiogênese. O domínio da peça intermediária é modificado durante o trânsito pelo epidídimo pela migração da gota citoplasmática da região anterior para posterior (KNOBIL & NEILL, 2006). Além disso, a forma da cabeça do espermatozoide pode mudar (TOSHIMORI, 1998), o acrossoma pode sofrer uma redução de tamanho (KNOBIL & NEILL, 2006) e proteínas da superfície da cabeça do espermatozoide podem migrar para outros domínios (HUNNICUTT et al., 1997).

Existe uma correlação entre o tempo de aparecimento de alguns componentes da membrana espermática durante a espermatogênese e sua localização final no espermatozoide (COWAN & MYLES, 1993). A hipótese para explicar tal fato é a de que a regulação temporal da expressão dos componentes da membrana os dirige para o seu domínio correto, com proteínas recém-sintetizadas sendo inseridas nos domínios mais anteriores. Não podendo migrar para domínios mais posteriores porque estão ancoradas no domínio anterior, ou barreiras existem para impedir a difusão entre os domínios (KNOBIL & NEILL, 2006).

2.3 – Capacitação e Reação Acrossomal

A capacitação espermática é um evento gradual e essencial para a fertilização que ocorre durante a exposição sequencial dos espermatozoides aos diferentes compartimentos do trato genital feminino. A capacitação espermática pode ser mimetizada durante a incubação *in vitro*, permitindo estudos detalhados dos mecanismos envolvidos no processo. Os espermatozoides capacitados *in vitro* são dotados de certas habilidades, como a penetração nas camadas de cumulus e a ligação à zona pelúcida (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

A primeira etapa da capacitação é um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , HCO_3^- , e peróxido de hidrogênio, que coletivamente ativam a produção de AMP cíclico

(cAMP) pelo sistema Adenil ciclase, o cAMP, por sua vez, ativa a proteína kinase A que fosforila certas proteínas (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

A subsequente reação acrossomal é um processo irreversível que leva à liberação de enzimas hidrolíticas habilitando o espermatozóide a penetrar a zona pelúcida. Após múltiplas fusões da membrana do acrossoma com a membrana espermática ocorre a liberação do conteúdo acrossomal. *In vivo*, a Reação Acrossomal é induzida pela interação do espermatozóide com a Zona Pelúcida e é sequencial e funcionalmente ligada à capacitação. A ligação do espermatozóide à zona pelúcida estimula proteínas G, subsequentemente aumenta o pH citosólico e inicia uma despolarização da membrana plasmática que resulta na abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e na liberação de Ca^{2+} dos compartimentos intracelulares. Este aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} causa a fosforilação de proteínas e finalmente resulta na Reação Acrossomal (WITTE & SCHÄFER-SOMI, 2007).

A capacitação e a reação acrossomal ocorrem na ausência de ovócitos, fora do trato genital feminino e em testes *in vitro* que mimetizaram as condições fisiológicas do trato genital da fêmea (BREITBART, 2002). A reação acrossomal pode ser induzida artificialmente em espermatozóides capacitados pela incubação com proteínas ZP solubilizadas ou com outras moléculas conhecidas como RA indutoras como ionóforos de P_4 ou Ca^{2+} (NEILD et al., 2005).

2.4 – Criopreservação do sêmen caprino

A criopreservação de sêmen em mamíferos é um processo complexo que envolve o balanceamento de muitos fatores. Para assegurar o sucesso, não somente o diluente, a taxa de diluição do esperma, a taxa de resfriamento e a taxa de congelamento corretos são requeridos, mas também um grande conhecimento da fisiologia espermática das espécies é essencial para maximizar a recuperação pós-descongelamento dos espermatozóides e, conseqüentemente a fertilidade. O sêmen caprino é um excelente exemplo disto, visto que, embora haja muitas similaridades com o sêmen de outras espécies, requer uma atenção especial para maximizar sua viabilidade pós-descongelamento. Por exemplo, uma interação deletéria entre a gema de ovo e as secreções da glândula bulbouretral existe no sêmen caprino, mas não existem nos sêmens de outras espécies como o touro, javali ou carneiro (PURDY, 2006).

Os diluentes mais comuns utilizados para a criopreservação de sêmen caprino contêm gema de ovo ou leite desnatado. Entretanto, a diluição de sêmen caprino com

diluentes contendo gema de ovo ou leite pode ser deletéria para os espermatozóides. As interações prejudiciais entre o plasma seminal e a gema de ovo foram observadas primeiramente por Roy (1957) e com o leite por Nunes et al. (1982).

Roy (1957) observou que os espermatozóides mantiveram sua motilidade em diluentes com gema de ovo com o plasma seminal removido, mas se o sêmen com o plasma fosse adicionado ao meio com gema de ovo, esta coagulava e os espermatozóides morriam. Foi determinado que a gema de ovo coagulava devido a uma enzima de origem bulbouretral, denominada Enzima coagulante da gema de ovo (EYCE).

Nunes et al. (1982) identificaram uma proteína (SBUIII) da glândula bulbouretral caprina, que diminuía a sobrevivência dos espermatozóides caprinos congelados com diluentes a base de leite. É provável que a EYCE e a SBUIII sejam a mesma proteína (LEBOEUF et al., 2000).

O método convencional de superar as interações prejudiciais do plasma seminal com a gema de ovo ou leite é diluir as amostras de sêmen caprino e então separar o plasma seminal do esperma por centrifugação (PURDY, 2006).

A lavagem do sêmen, entretanto, é um processo que pode danificar as células se realizado incorretamente, mas pode ser benéfico se realizado de forma correta. Os benefícios da remoção do plasma seminal variam. Certas pesquisas indicam que a remoção do plasma seminal é necessária para maximizar a motilidade pós-descongelamento e a integridade acrossomal no sêmen caprino (DROBNIS et al., 1980; MEMON et al., 1985), enquanto outros trabalhos mostram resultados positivos para o sêmen congelado sem a remoção do plasma seminal (AZERÊDO et al., 2001).

2.4.1 – Diluentes

O objetivo de se usar um diluente na criopreservação é suprir os espermatozóides com fontes de energia, proteger as células de danos causados pela temperatura e manter temporariamente um ambiente favorável para que os espermatozóides sobrevivam. Em geral, os meios para criopreservação do sêmen caprino incluem um crioprotetor não-penetrante (leite ou gema de ovo), um crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), um buffer (tris ou test), açúcares (glicose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (PURDY, 2006).

Vários tipos de diluentes já foram testados na criopreservação do sêmen caprino com resultados variáveis. Azerêdo et al. (2001), analisando a integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos descongelados com e sem plasma seminal, utilizaram Tris (Tris 4,039%, ácido cítrico 2,316%, glicose 0,667%, gema de ovo 2,6%, glicerol 5,3%, penicilina 100 000 UI, estreptomicina 1mg/ml de diluente) como diluente base.

Tha (2005), estudando sobre inseminação artificial e congelamento de sêmen caprino diluiu uma parte de sêmen com três partes de diluente. Para determinar um melhor diluente para o congelamento, testou duas soluções. A solução 1 continha (em 100 ml): lactose 11% 75 ml, gema de ovo 20 ml, glicerol 5ml, penicilina 100 000 UI, estreptomicina 0,1mg e pressão osmótica de 1283 mosmol/kg. A solução 2 continha (em 100 ml): Tris, frutose e ácido cítrico 73 ml, gema de ovo 20 ml, glicerol 7 ml, penicilina 100 000 UI, estreptomicina 0,1mg e pressão osmótica de 1563 mosmol/kg. O estudo ainda mostrou que a segunda solução pode ser usada para congelar sêmen com boa motilidade espermática depois da diluição e equilíbrio.

2.4.2 – Crioprotetores

Os crioprotetores são fundamentais para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de criopreservação. A utilização de diversos crioprotetores e suas combinações pode minimizar e controlar os efeitos deletérios na célula durante os processos de congelamento e descongelamento (ROSSI et al., 2003).

O glicerol, crioprotetor celular, é largamente utilizado para o congelamento de sêmen caprino, cuja concentração usada em diferentes estudos varia de 3% a 9%, com melhores resultados entre 4% a 7% do diluente utilizado (LEBOEUF et al., 2000). O glicerol tem a função de aumentar o volume de canais de solventes descongelados e diluir as altas concentrações de sais durante o processo de resfriamento (SQUIRES et al., 1999). Apesar disso, a sua presença está relacionada com a queda da fertilidade do sêmen congelado nos equinos (SQUIRES et al., 1999). Assim, algumas substâncias classificadas como crioprotetores intracelulares têm sido utilizadas como uma alternativa para os diluidores de congelamento de sêmen, como os crioagentes do grupo dos álcoois – etanol, etilenoglicol, metanol, polietilenoglicol e propilenoglicol – e as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e dimetil-sulfóxido, além de outras (SNOECK, 2003).

As amidas têm demonstrado bom potencial como agentes crioprotetores, provavelmente por sua menor toxicidade e seu mais baixo peso molecular (AMANN & PICKETT, 1987; MEDEIROS et al., 2002), entretanto, segundo Silva et al., (2006) a utilização da dimetil-formamida como crioprotetor isolado ou associado ao glicerol, em comparação à utilização única de glicerol, não foi superior na manutenção da qualidade espermática após a criopreservação.

Bittencourt et al., (2005) mostraram que a utilização do etilenoglicol como crioprotetor, associado ou não ao EDTA, foi mais eficaz em promover a manutenção da integridade morfofuncional da membrana dos espermatozóides caprinos criopreservados em comparação ao glicerol e glicerol + EDTA.

2.5 – Radicais Livres

Os radicais livres gerados por sistemas enzimáticos e não-enzimáticos e as espécies reativas de oxigênio (ROS) como radicais hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio podem atacar ácidos graxos poliinsaturados causando peroxidação lipídica (MUNNE-BOSC, 2005).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um evento fisiológico normal em vários órgãos incluindo os testículos. A superprodução de ROS, entretanto, pode ser prejudicial ao esperma, sendo associada à infertilidade em machos (AKIYAMA, 1999).

Os danos acumulados em longo prazo causados pelos radicais livres estão implicados em várias condições e doenças degenerativas (TEMPLE, 2000).

Existe um balanço entre a produção e remoção de ROS no sistema reprodutivo do macho. Pequenas quantidades de ROS desempenham um papel importante na função espermática normal como a capacitação e a fusão espermatozóide-ovócito (TEMPLE, 2000), mas podem causar efeitos patológicos com o estresse oxidativo quando a quantidade de ROS excede a quantidade de antioxidantes (SIKKA et al., 1995).

A peroxidação lipídica no espermatozóide pode ocorrer devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, assim, quando a produção de ROS excede a atividade de limpeza do sistema antioxidante, ocorre peroxidação da membrana lipídica do espermatozóide e funcionamento anormal (SIKKA et al., 1995).

(SINCLAIR, 2000). Antioxidantes podem proteger os espermatozóides contra os efeitos danosos de ROS (BAKER et al., 1996).

A vitamina E pode reduzir os danos oxidativos nos órgãos reprodutivos causados pela peroxidação lipídica. Trabalhando com suplementação de vitamina E em caprinos jovens da raça Boer, Hong et al., (2009) mostraram que a vitamina E pode aumentar o peso do epidídimo, a densidade numérica dos túbulos seminíferos e das células espermatogênicas e os diâmetros dos túbulos seminíferos e dos ductos do epidídimo, especialmente nas concentrações de 80 à 320 UI/animal/dia.

A vitamina E protege o epidídimo contra a peroxidação lipídica induzida por bimetoxicloro via aumento de enzimas antioxidantes e diminuição da geração de ROS (AITKEN & CLARKSON, 1987). A suplementação de vitamina E também aumentou a atividade da Superóxido Dismutase no sêmen bovino (BECONI et al., 1991). Além disso, a suplementação de vitamina E estimulou o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (ZHU et al., 2009) e aumentou a atividade da superóxido dismutase, além de reduzir o conteúdo de óxido nítrico no testículo de caprinos Boer (HONG et al., 2010).

A Vitamina E é considerada um componente primário do sistema antioxidante do espermatozóide (SURAI et al., 1998), e é um dos principais protetores de membrana contra ROS (AKIYAMA, 1999). A suplementação com Vitamina E levou a um aumento da concentração espermática em javalis (BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995). Alguns estudos mostraram melhorias na quantidade e qualidade do esperma com suplemento de Vitaminas C e E (YOUSEF et al., 2003).

2.7 – Equex (Orvus ES Paste)

O Equex é um detergente e agente emulsificante sintético, a sua utilização em diluentes de sêmen justifica-se por sua função de emulsificar os componentes lipídicos dos diluentes, principalmente nos diluentes a base de gema de ovo. O Equex é conhecido por conter principalmente lauril sulfato de sódio em sua composição.

Segundo Arriola & Foote (1987), o lauril sulfato de sódio exerce seu efeito ao promover a modificação da estrutura das lipoproteínas da gema de ovo no meio extracelular.

O Equex é utilizado em diluentes de sêmen há alguns anos, Pursel et al. (1978) utilizando diferentes concentrações de Equex em diluentes de sêmen de javali,

mostraram que o Equex protegeu o espermatozoide dos danos do processo de congelamento, o mesmo efeito foi observado por Tsutsui et al. (2000) com sêmen canino e por Mizutani (2009) com sêmen felino.

A adição do Equex ao diluidor Tris-gema de ovo promoveu uma maior manutenção da viabilidade dos espermatozoides caprinos pós-descongelamento, quando comparado com diluidores que não o continham (BITTENCOURT et al., 2008). Em ovinos, o Equex apresentou efeito benéfico à motilidade espermática pós-descongelamento, quando adicionado ao meio Tris-gema nas concentrações de 0,5 ou 1% (MAIA et al., 2007).

A ação emulsificante do Orvus es Paste permite sua utilização de outras formas, Borges (2003) utilizou o Equex para dissolver a Vitamina E em solução aquosa para posterior adição em diluente de sêmen bovino.

2.8 – Teste Hiposmótico (HOST)

Uma das propriedades importantes da membrana celular, inclusive a membrana espermática, é o transporte seletivo de moléculas que pode ser observado quando uma célula é exposta a condições hiposmóticas, permitindo a entrada de água para o meio intracelular até atingir o equilíbrio osmótico. Esse processo ocorre somente nos espermatozoides que possuem a membrana plasmática viável. Devido ao influxo de água, ocorre edema celular, visualizado pelo enrolamento na região da cauda, local de maior susceptibilidade ao edema celular (JEYENDRAN et al., 1984).

O teste hiposmótico foi primeiro proposto para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides humanos. Posteriormente, foi adaptado para diversas espécies de animais domésticos, sendo hoje utilizado como um dos testes complementares na avaliação da qualidade do sêmen de reprodutores (PALHÃO, 2006).

O teste hiposmótico baseia-se na observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (SANTOS et al., 2001). Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

O HOST tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: humanos (JEYENDRAN et al., 1984), eqüinos (ALVES et al., 2004; MELO, 1999), caninos (KUMI-DIAKA,

1993), ovinos (OBERST et al., 2003) e caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003).

Jeyendran et al. (1984), ao descreverem a utilização da técnica para avaliação do espermatozóide humano, testaram soluções com osmolaridades que variaram de 50 a 300 mOsmol, obtendo os melhores índices de reação espermática ao teste ao utilizarem soluções a 150 mOsmol/L, ou menos. Os mesmos autores também testaram diferentes solutos (citrato de sódio, sucrose, melitose, frutose e cloreto de sódio) e suas associações, e verificaram que a taxa de reação espermática variava de acordo com a solução usada, dentro da mesma faixa de osmolaridade. Obtiveram os melhores resultados com a utilização da associação entre citrato de sódio (50%) e frutose (50%) a 150 mOsmol/L, incubada por 30 minutos a 37 °C, razão por que escolheram esse protocolo como padrão para todos os outros experimentos a serem realizados futuramente.

Trabalhando com sêmen caprino, Fonseca et al. (2001), utilizaram uma solução hiposmótica formulada pela combinação de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) em água destilada e testaram osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol/L. Os autores observaram que a maior porcentagem de espermatozóides reativos ao teste e com um maior grau de reação (dobramento de cauda e edema) foi encontrada em solução hiposmótica a 125 e 150mOsmol/L. Santos et al. (2001) também encontraram bons resultados, trabalhando com essa mesma combinação de solutos, a 60 mOsmol. Esses autores, porém, trabalharam com um tempo de incubação de 60 minutos, a 37 °C. Esse tempo é superior ao preconizado por Caiza De La Cueva et al. (1997) que citam que o tempo ideal para que ocorram as reações é de 20 a 30 minutos.

Estudos têm demonstrado a correlação do HOST com a fertilidade *in vitro* do sêmen de touros (ROTA et al., 2000), de hâmsers (JEYENDRAN et al., 1984) e com a motilidade espermática do sêmen canino descongelado (KUMI-DIAKA, 1993). Esse teste também é importante por acusar alterações intensas da funcionalidade espermática, em amostras que não seriam condenadas somente pelos resultados das avaliações de motilidade e morfologia espermáticas (MELO, 1999).

Após o período de incubação, as amostras do teste hiposmótico podem ser fixadas com solução de formol-salina tamponada para serem avaliadas futuramente, sem comprometer, com isso, os resultados (ALVES et al., 2004 citado por Bittencourt et al., 2005).

O cálculo do número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico pode ser realizado por intermédio da seguinte fórmula citada por Bittencourt et al. (2005):

HO% = (% de alterações na região da cauda após teste HOST) – (% de alterações na região da cauda antes do teste HOST).

2.9 – Teste de Termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência (TTR) consiste na incubação de uma amostra de sêmen em banho-maria, por tempo pré-estabelecido e sob determinada temperatura, avaliando-se, ao longo do tempo, a motilidade progressiva e o vigor espermático (DIMITROPOULOS, 1967 citado por BORGES, 2003).

O teste de termorresistência é utilizado para avaliar o comportamento (motilidade e vigor) dos espermatozóides quando incubados a 37 °C por determinado tempo e, desta forma, predizer a fertilidade seminal (BARNABE et al., 1981).

O teste de termorresistência rápido aplicado na avaliação de sêmen congelado constitui-se como uma prova de grande aplicabilidade (ARRUDA et al., 1997), especialmente por sua correlação com fertilidade a campo. Outros trabalhos verificaram a associação da resistência dos espermatozóides imposta ao período de incubação estabelecido em testes de termorresistência com importantes implicações fisiológicas e práticas, sendo que as correlações com fertilidade *in vitro* e a campo mostraram-se presentes (VISHWANATH & SHANNON, 1997).

Segundo Santos et al. (2006), o teste de termorresistência mostrou-se útil para predizer a longevidade do sêmen caprino pós-descongelamento.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de março a junho de 2010 no setor de Caprinocultura e no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil. O município está localizado a uma altitude de 649 m e tem como coordenadas geográficas o paralelo de 20°45'14'', latitude sul, e o meridiano de 42°52'54'', longitude oeste. A temperatura média anual é de 18,5 °C e o clima da região é, segundo a classificação de Köppen, do tipo Cwa - clima tropical de altitude com inverno seco e verão chuvoso.

3.1 – Animais, alimentação e sanidade

Foram utilizados dois reprodutores caprinos da raça Parda Alpina, com boa condição corporal, aproximadamente três anos de idade, avaliados e aprovados para reprodução por meio de exame andrológico de acordo com os padrões de qualidade de sêmen *in natura* preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

A alimentação foi feita duas vezes ao dia com silagem de milho e concentrado protéico (550 g/dia). Água e sal mineral fornecidos *ad libitum*.

O manejo sanitário empregado foi o mesmo utilizado para o rebanho da referida granja, com os animais mostrando-se vacinados contra clostridioses e vermifugados periodicamente para endo e ectoparasitas.

3.2 – Avaliação física e morfológica do sêmen

O período de coleta se estendeu dos meses de abril a maio de 2010, no início da estação de monta da espécie caprina. Foram utilizadas fêmeas em estro natural como manequim, contidas em tronco de coleta. Os ejaculados foram obtidos por meio de vagina artificial (Figura 02), com temperatura em torno de 42 a 44 °C no momento da coleta e pressão de 40 a 60 mmHg, onde se obteve 1 ejaculado/animal a cada 2 dias durante três semanas, totalizando 8 ejaculados/animal.



Figura 02 – Vagina Artificial para coleta de sêmen (Modelo Artesanal).

Os ejaculados coletados foram armazenados em tubos graduados protegidos de luz solar.

Após as coletas, foram realizadas as análises físicas do sêmen: volume (mL), aspecto (aquoso, opalescente, leitoso e cremoso), motilidade progressiva espermática (0-100%), vigor (0-5) e turbilhonamento (0-5) e foram separadas amostras para avaliações da morfologia e concentração espermática (sptz/mL) e para os testes complementares (Teste Hiposmótico e Teste de Termorresistência).

Uma gota de sêmen de cada ejaculado foi colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37 °C em aumento microscópico de 100X, onde foi avaliado o turbilhonamento. Posteriormente, colocou-se uma lamínula previamente aquecida a 37 °C sobre uma gota de sêmen, e em aumento de 100X foram avaliados a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático de acordo com o preconizado pelo CBRA (1998).

Em tubo *ependorf* de 2,0 mL contendo 1 mL de solução de formol-salina tamponada foram acondicionadas alíquotas do sêmen suficiente para turvar a solução, para a análise morfológica dos espermatozóides por meio de preparação úmida com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1000X. Foram contabilizadas 200 células por ejaculado, mensurados em percentagem os defeitos espermáticos e classificados em defeitos maiores e defeitos menores segundo os critérios preconizados pelo CBRA (1998).

3.3 – Preparo das soluções estoques de Vitamina E

Vitamina E – obtida da empresa SIGMA-ALDRICH® - EUA na forma de Acetato de Vitamina E oleoso (DL- α -Tocopherol acetate, cod.T3376-25G) com 96% de pureza.

As soluções estoques de vitamina E foram preparadas de acordo com o preconizado por Borges (2003).

Com auxílio de uma seringa foram coletados 1,6 mL de Equex sendo em seguida diluído em 200 mL de água destilada, obtendo uma solução de Equex a 0,8% v/v. Dessa solução, 50 mL foram acondicionados em *ependorfs* de 0,5 mL e congelados a -20 °C até sua utilização.

Os outros 150 mL foram divididos em três partes de 50 mL cada para a posterior adição de Vitamina E. Em cada uma dessas soluções de Equex foram dissolvidas as concentrações de vitamina E: 2,5 mM, 5,0 mM e 10,0 mM. A homogeneização foi realizada em agitador magnético e de forma intensa, contudo, cuidadosa para evitar a formação de bolhas. Estas soluções foram armazenadas em *ependorfs* de 0,5 mL e congeladas a -20 °C.

Após o descongelamento de cada *ependorf*, a solução restante foi descartada, devido ao aquecimento em banho-maria a 37 °C e manuseio. Como a vitamina E é fotossensível, a sua pesagem foi feita em local com pouca luminosidade.

3.4 – Diluição, Resfriamento, Congelamento e Descongelamento do sêmen

Após o exame físico, uma alíquota de 10 μ L de sêmen *in natura* foi colocada em 1,99 mL de solução formol-salina tamponada para determinação da concentração espermática (método hematocimétrico), cálculo do número de doses e do volume final de diluente a ser adicionado.

A composição do diluente base empregado neste experimento está descrita na tabela 01.

A vitamina E e o Equex foram acrescentados nas diluições finais, sendo fixado 10 μ L de solução estoque por mL. A tabela 02 mostra a composição final dos diluentes de cada tratamento.

Tabela 01 – Composição química do diluente base (BIOXCELL®):

| COMPONENTES | g/L |
|------------------------------|------------|
| Tris | 2,3 |
| Citrato de Sódio | 6,2 |
| Cloreto de Potássio | 0,8 |
| Frutose | 1,2 |
| Lactose Monohidratada | 0,8 |
| Glicina | 0,2 |
| Glicose Anidra | 0,5 |
| Taurina | 0,005 |
| Sulfato de Gentamicina | 0,24 |
| Tartarato de Tilosina | 0,33 |
| Lincospectina 100 | 0,383 |
| Glicerol | 40,2 |
| Hidrato de Lactato de Cálcio | 0,7 |
| Lecitina de Soja | 1,5 |
| Ácido Cítrico Monohidratado | 2,5 |
| Água Ultra Pura q.s.p. | 1000 mL |

Fonte: IMV® - Brasil.

Tabela 02 – Composição dos diluentes de cada tratamento:

| TRATAMENTOS | COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES |
|--------------------|---|
| Controle | BIOXCELL® |
| Equex | BIOXCELL® + Equex 0,008% |
| VE 25µM | BIOXCELL® + Vitamina E 25µM + Equex 0,008% |
| VE 50µM | BIOXCELL® + Vitamina E 50µM + Equex 0,008% |
| VE 100µM | BIOXCELL® + Vitamina E 100µM + Equex 0,008% |

O Equex esteve presente em todos os tratamentos com exceção do Tratamento Controle, pois serviu de emulsificador da vitamina E, visto que esta é lipossolúvel. Dessa forma, o tratamento Equex continha o diluente base adicionado apenas de Equex, este grupo serviu de controle para os tratamentos com vitamina E associada ao Equex.

Realizada a diluição final, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL contendo 50 milhões de espermatozoides.

As palhetas foram colocadas em tubos de ensaio de 20 mL revestidos por um refil e em seguida colocados dentro de um recipiente de plástico contendo álcool etílico absoluto. O recipiente foi colocado em posição horizontal dentro de uma geladeira, com temperatura interna de 5 °C, durante 60 minutos, como descrito por Fürst (2002).

Após o resfriamento, procedeu-se o congelamento vertical do sêmen, as palhetas foram dispostas sobre uma grade, 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, durante 15 minutos. Sequencialmente, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196 °C para o congelamento final do sêmen, sendo, em seguida, colocadas na raque e transferidas para botijão contendo nitrogênio líquido.

As partidas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em tubos *ependorf* e homogeneizadas para análise imediata da motilidade e vigor espermáticos, por meio de microscopia com contraste de fase, em aumento de 100X.

3.5 – Teste de Termorresistência (TTR)

Foi feito o Teste de Termorresistência do sêmen descongelado. O sêmen foi incubado a 37 °C por três horas, de modo que, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos deste período, fossem avaliados, sempre pelo mesmo observador, a motilidade espermática progressiva e o vigor, por meio de microscópio com contraste de fase acoplado em aumento de 100X.

3.6 – Teste Hiposmótico

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo Teste Hiposmótico, utilizando-se solução hiposmótica de 100 mOsmol/kg como preconizado por Sousa et al. (2000) e por Fonseca et al. (2001). Para o preparo da solução hiposmótica foram dissolvidos em 1000 mL de água deionizada, 9 g de frutose e 4,9 g de citrato trissódico (REVELL & MRODE, 1994).

Foi realizado o teste hiposmótico do sêmen *in natura*, fresco diluído (pré-resfriamento) e descongelado para verificar as alterações de membrana ocasionadas pelo processo de congelamento.

A retirada das alíquotas de sêmen para o teste hiposmótico foi realizada conjuntamente ao teste de termorresistência, a cada 60 minutos uma alíquota de 20 µL

de sêmen foi adicionada a 1 mL de solução hiposmótica e incubada por meia hora em banho-maria a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de solução de formol-salina tamponada às amostras para fixação das mesmas.

Cada amostra foi montada entre lâmina e lamínula e analisada em microscopia de contraste de fase, em aumento de 1000X, onde foram analisados 100 espermatozóides por amostra. Os espermatozóides foram classificados quanto à presença ou não de cauda enrolada. O resultado foi determinado em percentagem, sendo o cálculo realizado da seguinte forma:

$$\text{HO\%} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST}).$$

3.7 – Análise estatística

Para análise estatística, as variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (teste de Lilliefors) e homocedasticidade (teste de Cochran & Bartlett) e, posteriormente, às análises de variância (ANOVA), aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para aquelas que apresentaram significância.

A determinação das relações entre as características estudadas foi feita pela correlação simples de Pearson.

A avaliação das médias e do erro-padrão da média foi realizada por meio de estatística descritiva.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Sêmen fresco

Os valores referentes às características físicas e ao teste hiposmótico do sêmen fresco estão apresentados nas Tabelas 03 e 04. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) com relação às características físicas e ao teste hiposmótico entre os dois animais utilizados neste experimento.

Tabela 03 – Características físicas do sêmen fresco de bodes da raça Parda Alpina criados em manejo intensivo (Média \pm erro-padrão):

| Animal | ASP | VOL | TURB | CONC |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Bode 1 | 2,75 \pm 0,25 | 0,87 \pm 0,09 | 2,94 \pm 0,29 | 3,37 \pm 0,39 |
| Bode 2 | 3,00 \pm 0,00 | 0,81 \pm 0,08 | 3,31 \pm 0,13 | 3,32 \pm 0,28 |
| Total | 2,88 \pm 0,13 | 0,84 \pm 0,06 | 3,13 \pm 0,16 | 3,35 \pm 0,23 |

$P > 0,05$. ASP = Aspecto (0 – 4); VOL = Volume (mL); TURB = Turbilhonamento (0 – 5); CONC = Concentração espermática (10^9 spz/mL).

Tabela 04 – Motilidade progressiva, vigor espermático e teste hiposmótico do sêmen fresco de bodes da raça Parda Alpina criados em manejo intensivo (Média \pm erro-padrão):

| Animal | MOT | VIG | HOST |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Bode 1 | 85,63 \pm 1,99 | 3,50 \pm 0,13 | 82,75 \pm 3,96 |
| Bode 2 | 82,50 \pm 1,89 | 3,63 \pm 0,16 | 84,13 \pm 5,41 |
| Total | 84,06 \pm 1,39 | 3,56 \pm 0,10 | 83,44 \pm 3,25 |

$P > 0,05$. MOT = Motilidade progressiva (%); VIG = Vigor espermático (0 – 5); HOST = Teste Hiposmótico.

Os parâmetros volume, motilidade, vigor e concentração espermática estão dentro dos valores preconizados pelo CBRA (1998). As médias do turbilhonamento e do aspecto do Bode 1 encontram-se ligeiramente abaixo dos valores preconizados pelo CBRA (1998). A intensidade do turbilhonamento é resultante da interação da motilidade, do vigor e da concentração espermática e todos esses parâmetros mostraram-se dentro dos valores recomendados (CBRA 1998). O turbilhonamento pode

ser afetado por fatores extrínsecos, como método de colheita, condições de preservação, temperatura da amostra e modo de colocação da amostra na lâmina.

O aspecto é a avaliação macroscópica do ejaculado, normalmente são avaliadas a cor e a aparência. Estes parâmetros dependem fundamentalmente da concentração de espermatozóides e eventualmente da presença de sangue, pus, urina, células epiteliais, detritos, etc. (SALVIANO & SOUZA, 2008). Hafez & Hafez (2004) afirmam que o sêmen do bode tem coloração que varia de branca acinzentada a amarela.

Segundo Mies Filho (1987), o sêmen dos animais pode apresentar-se com aspecto cremoso (com variações desde o cremoso espesso ao cremoso fino), leitoso, opalescente ou soroso e aquoso. Segundo este autor, à simples vista, pode-se efetuar a valoração do ejaculado, de forma empírica, quanto à sua riqueza em espermatozóides. Apesar do valor médio do aspecto do ejaculado do bode 1 ter-se apresentado ligeiramente abaixo do valor preconizado pelo CBRA (1998), o valor médio da concentração espermática manteve-se normal.

Os valores de motilidade, vigor e volume foram semelhantes aos encontrados para a raça Parda Alpina por Rovay (2006), mas ligeiramente inferiores aos encontrados por Castilho (2008) para a mesma raça. A concentração espermática apresentou valores superiores aos relatados por Bispo (2009), tal diferença pode ser explicada pelo fato de os animais deste experimento serem mais jovens (3 anos) que os daquele (8 anos).

Os valores encontrados para o teste hiposmótico neste trabalho mostraram-se superiores aos encontrados por Castilho (2008), Rovay (2006) e Bispo (2009), os três autores trabalharam com solução hiposmótica de 100 mOsm/Kg.

Na Tabela 05 estão sumarizadas as características morfológicas (defeitos menores, defeitos maiores, defeitos totais e espermatozóides normais) do sêmen fresco.

Tabela 05 – Características morfológicas do sêmen fresco de bodes Pardo alpinos adultos, criados em manejo intensivo (Média ± erro-padrão):

| Animal | DME | DMA | DFT | ESN |
|---------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Bode 1 | 12,48 ± 2,86 | 3,22 ± 0,54 | 15,70 ± 3,21 | 84,30 ± 3,21 |
| Bode 2 | 12,40 ± 2,84 | 2,49 ± 0,66 | 14,89 ± 2,61 | 85,11 ± 2,61 |
| Total | 12,44 ± 1,95 | 2,83 ± 0,43 | 15,27 ± 1,97 | 84,73 ± 1,97 |

P > 0,05. DME = Defeitos menores em %; DMA = Defeitos maiores em %; DFT = Defeitos totais em %; ESN = Espermatozóides normais em %.

As características morfológicas do sêmen fresco não apresentaram diferenças estatísticas entre os dois animais utilizados neste experimento ($P > 0,05$).

As anormalidades espermáticas encontradas no sêmen fresco neste experimento encontram-se dentro dos parâmetros aceitáveis e preconizados pelo CBRA (1998). Os defeitos menores e defeitos totais mostraram valores semelhantes aos relatados por Santos et al. (2006) e por Martins (2001) para bodes adultos da raça Parda alpina, embora os defeitos maiores serem inferiores quando comparados aos dos mesmos autores.

As características físicas e morfológicas do sêmen utilizado neste experimento demonstram a confiabilidade dos animais utilizados no estudo. A boa qualidade dos ejaculados obtidos respaldaram a sua utilização no estudo de congelamento dos espermatozoides.

Na Tabela 06 são mostradas as correlações entre as características físicas e morfológicas e do teste hiposmótico do sêmen fresco dos animais utilizados neste estudo.

Tabela 06 – Correlações simples de Pearson entre as características físicas e morfológicas e teste hiposmótico do sêmen fresco de bodes Pardo alpinos adultos, criados em manejo intensivo:

| | ASP | VOL | TUR | MOT | VIG | CON | DME | DMA | DFT | HOST |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| ASP | 1 | NS | 0,67 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| VOL | | 1 | NS | NS | -0,55 | NS | -0,52 | NS | -0,53 | 0,44 |
| TUR | | | 1 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| MOT | | | | 1 | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| VIG | | | | | 1 | NS | NS | NS | NS | NS |
| CON | | | | | | 1 | NS | -0,48 | NS | NS |
| DME | | | | | | | 1 | NS | 0,98 | NS |
| DMA | | | | | | | | 1 | NS | NS |
| DFT | | | | | | | | | 1 | NS |

NS = Não significativo ($P > 0,05$); ASP = Aspecto; VOL = Volume; TUR = Turbilhonamento; MOT = Motilidade progressiva; VIG = Vigor espermático; CON = Concentração espermática; DME = Defeitos menores; DMA = Defeitos maiores; DFT = Defeitos totais.

Não houve correlação da motilidade progressiva com outras variáveis. O aspecto apresentou correlação positiva ($r = 0,67$) com o turbilhonamento, demonstrando que em ejaculados com maior turbilhonamento houve maiores valores de aspecto.

O volume apresentou correlação média negativa com o vigor espermático, defeitos menores e defeitos totais ($r = -0,55$, $r = -0,52$ e $r = -0,53$, respectivamente) mostrando que em ejaculados de maior volume houve menor vigor espermático e menores valores de defeitos menores e defeitos totais. O volume ainda mostrou correlação positiva com o teste hiposmótico ($r = 0,44$), demonstrando que em ejaculados de maior volume houve maior porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico. Estes resultados mostraram-se contrários aos relatados por Castilho (2008), que encontrou correlação negativa ($r = -0,46$) entre volume e teste hiposmótico, segundo este autor, tal efeito foi pela frequência das coletas que ocasionou queda do volume do ejaculado durante o experimento, tal efeito não foi observado neste experimento.

Houve correlação média negativa ($r = -0,48$) entre a concentração de espermatozóides e os defeitos maiores, mostrando que foram encontrados menores valores de defeitos maiores em ejaculados com maior concentração espermática.

Os valores de defeitos menores e defeitos totais apresentaram correlação forte e positiva ($r = 0,98$), mostrando que a maior parte dos defeitos espermáticos presente nos ejaculados foram defeitos menores (Tabela 04).

4.2 – Sêmen Descongelado

Na tabela 07 estão apresentados os resultados da motilidade progressiva do sêmen diluído (pré-resfriado) e do sêmen descongelado durante o teste de termorresistência de todos os tratamentos deste estudo.

Observa-se pelos dados apresentados na tabela 07, que a adição de Vitamina E ao sêmen nas concentrações de $25\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ não afetou a motilidade progressiva do sêmen pré-resfriado e do sêmen descongelado submetido ao teste de termorresistência de 0, 1, 2, 3 horas.

Tabela 07 – Motilidade progressiva no teste de termorresistência de sêmen caprino diluído em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão):

| Tratamento | Pré-resfriado | | Descongelado | | |
|-----------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | MOT DIL | MOT 0H | MOT 1H | MOT 2H | MOT 3H |
| Controle | 81,88 ± 1,11 | 43,75 ± 3,49 | 28,75 ± 3,94 | 17,81 ± 3,68 | 8,75 ± 1,74 |
| Equex | 79,69 ± 1,68 | 47,19 ± 4,65 | 32,50 ± 4,40 | 19,06 ± 3,57 | 10,63 ± 2,58 |
| VE 25µM | 78,44 ± 1,18 | 40,63 ± 3,92 | 29,38 ± 3,62 | 20,00 ± 3,74 | 9,06 ± 2,47 |
| VE 50µM | 80,94 ± 1,23 | 44,38 ± 2,70 | 32,50 ± 2,85 | 21,88 ± 2,92 | 8,44 ± 2,27 |
| VE 100µM | 79,38 ± 1,64 | 50,00 ± 2,58 | 34,06 ± 3,04 | 20,31 ± 2,94 | 8,44 ± 1,49 |

P > 0,05. MOT = Motilidade progressiva; VE = Vitamina E; H = Hora do teste de termorresistência; DIL = Sêmen diluído (pré-resfriado).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Borges (2003) e Upreti et al. (1997) que também não encontraram melhora na motilidade progressiva com a adição de Vitamina E ao diluente de sêmen bovino e ovino, respectivamente, nas mesmas concentrações deste estudo.

O efeito do Equex sobre o congelamento de sêmen já foi reportado em diferentes espécies, como javalis (PURSEL et al., 1978), caninos (TSUTSUI et al. 2000), ovinos (MAIA et al., 2007), caprinos (BITTENCOURT et al., 2008) e felinos (MIZUTANI, 2009). Estes autores mostraram a ação benéfica do Equex na motilidade progressiva do sêmen descongelado nas concentrações de 0,5 a 1%, porém no presente estudo, a adição do Equex não melhorou a motilidade progressiva do sêmen descongelado (a concentração de Equex utilizada neste experimento (0,008%) foi muito inferior às utilizadas pelos autores descritos acima).

Na tabela 08 estão apresentados os resultados do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriado) e descongelado durante o teste de termorresistência de todos os tratamentos deste estudo.

Observa-se pelos dados apresentados na tabela 08, que a adição de Vitamina E ao sêmen nas concentrações de 25µM, 50µM e 100µM não afetou o vigor espermático do sêmen pré-resfriado e do sêmen descongelado submetido ao teste de termorresistência de 0, 1, 2, 3 horas.

Tabela 08 – Vigor espermático no teste de termorresistência de sêmen caprino diluído em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão):

| Tratamento | Pré-resfriado | | Descongelado | | |
|-----------------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| | VIG DIL | VIG 0H | VIG 1H | VIG 2H | VIG 3H |
| Controle | 3,66 ± 0,13 | 2,53 ± 0,17 | 1,69 ± 0,19 | 1,06 ± 0,16 | 0,69 ± 0,12 |
| Equex | 3,47 ± 0,16 | 2,41 ± 0,21 | 1,84 ± 0,16 | 1,16 ± 0,18 | 0,72 ± 0,14 |
| VE 25µM | 3,31 ± 0,15 | 2,44 ± 0,24 | 1,78 ± 0,12 | 1,22 ± 0,16 | 0,69 ± 0,16 |
| VE 50µM | 3,47 ± 0,13 | 2,41 ± 0,19 | 1,94 ± 0,14 | 1,25 ± 0,13 | 0,59 ± 0,12 |
| VE 100µM | 3,47 ± 0,15 | 2,75 ± 0,16 | 2,00 ± 0,14 | 1,41 ± 0,14 | 0,72 ± 0,11 |

P > 0,05. VIG = Vigor espermático; VE = Vitamina E; H = Hora do teste de termorresistência; DIL = Sêmen diluído (pré-resfriado).

De acordo com Borges (2003) a adição de Vitamina E, Equex e Vitamina C ao diluente de sêmen bovino melhora a manutenção do vigor espermático ao longo do teste de termorresistência, contudo este efeito não foi observado com a adição somente de vitamina E. Upreti et al. (1997) relataram que a adição de Vitamina E ao diluente de sêmen ovino também não levou ao aumento do vigor espermático do sêmen descongelado.

Na tabela 09 estão apresentados os resultados do teste hiposmótico do sêmen diluído (pré-resfriado) e do sêmen descongelado.

Tabela 09 – Percentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico do sêmen caprino diluído em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão):

| Tratamento | Pré-resfriado | | Descongelado | | |
|-----------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | HOST DIL | HOST 0H | HOST 1H | HOST 2H | HOST 3H |
| Controle | 71,07 ± 2,67 | 18,66 ± 2,75 | 12,67 ± 1,74 | 9,54 ± 1,35 | 7,23 ± 1,23 |
| Equex | 63,21 ± 3,39 | 20,43 ± 2,13 | 13,71 ± 1,90 | 13,15 ± 2,15 | 8,77 ± 1,51 |
| VE 25µM | 67,86 ± 2,85 | 19,71 ± 1,87 | 13,40 ± 1,48 | 10,08 ± 1,73 | 7,90 ± 1,76 |
| VE 50µM | 70,64 ± 2,55 | 20,49 ± 1,87 | 14,18 ± 1,97 | 10,09 ± 1,59 | 9,53 ± 1,89 |
| VE 100µM | 72,93 ± 2,85 | 19,00 ± 1,90 | 12,40 ± 1,05 | 10,09 ± 1,15 | 8,34 ± 1,33 |

P > 0,05. HOST = Teste hiposmótico; VE = Vitamina E; H = Hora do TTR em que as amostras de sêmen foram incubadas para o teste hiposmótico; DIL = Sêmen diluído (pré-resfriado).

Observa-se pelos dados apresentados na tabela 09, que a adição de Vitamina E ao sêmen nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M não afetou a porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico do sêmen pré-resfriado e do sêmen descongelado submetido ao teste de termorresistência de 0, 1, 2, 3 horas.

Pelo teste hiposmótico é possível inferir que a Vitamina E e o Equex não melhoraram a integridade estrutural da membrana espermática ($P > 0,05$). Estes resultados estão de acordo com Borges (2003), que demonstrou que a adição de vitamina E e Equex ao diluente de sêmen bovino não levou a melhora da integridade funcional da membrana espermática.

Na Tabela 10 encontram-se as correlações de Pearson entre a motilidade progressiva e o vigor espermático do teste de termorresistência e o teste hiposmótico para cada tratamento.

Foi observada correlação positiva entre motilidade e vigor em todos os tratamentos no sêmen diluído (pré-resfriado) e em todos os tempos do TTR.

Não houve correlação entre o vigor e o teste hiposmótico em nenhum dos tratamentos no sêmen diluído e nos tempos 0H e 2H do TTR, havendo correlação média positiva no tratamento Equex no tempo 1H ($r = 0,51$) e nos tratamentos Controle, Equex e VE 50 μ M no tempo 3H ($r = 0,44, 0,69, 0,57$, respectivamente). Estes resultados indicam que o vigor espermático não é um bom parâmetro para a avaliação da integridade funcional da membrana espermática.

Houve correlação entre a motilidade e o teste hiposmótico do sêmen diluído no tratamento VE 50 μ M ($r = 0,68$). O sêmen descongelado das amostras de sêmen dos tratamentos Equex e Vit. E 100 μ M mostraram correlações entre motilidade e teste hiposmótico.

De forma geral, as correlações entre motilidade e teste hiposmótico não mantiveram um padrão de comportamento, dessa forma, não é possível afirmar que a motilidade progressiva é um bom parâmetro para a predição da integridade funcional da membrana espermática.

O parâmetro motilidade espermática parece não ser isoladamente eficaz em prever a viabilidade espermática de sêmen congelado para uso em programas de inseminação artificial, sendo necessário uso de testes complementares que possam elevar a acurácia em prever a fertilidade do sêmen (CASTILHO, 2008). Tal observação é respaldada pelo presente experimento em que os valores médios obtidos

no teste hiposmótico foram inferiores aos da motilidade espermática, indicando menor concentração de espermatozóides viáveis e com potencial fecundante por dose.

Tabela 10 – Correlações Simples de Pearson entre a motilidade progressiva e o vigor espermático do teste de termorresistência e o teste hiposmótico para cada tratamento.

| | DIL | 0H | 1H | 2H | 3H |
|-------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Controle | | | | | |
| HOSTxMOT | NS | NS | 0,53 | NS | 0,61 |
| HOSTxVIG | NS | NS | NS | NS | 0,44 |
| MOTxVIG | 0,50 | 0,61 | 0,82 | 0,74 | 0,73 |
| Equex | | | | | |
| HOSTxMOT | NS | 0,42 | 0,66 | 0,52 | 0,69 |
| HOSTxVIG | NS | NS | 0,51 | NS | 0,69 |
| MOTxVIG | 0,81 | 0,80 | 0,85 | 0,72 | 0,87 |
| Vitamina E 25µM | | | | | |
| HOSTxMOT | NS | NS | NS | NS | 0,47 |
| HOSTxVIG | NS | NS | NS | NS | NS |
| MOTxVIG | 0,65 | 0,81 | 0,48 | 0,76 | 0,80 |
| Vitamina E 50µM | | | | | |
| HOSTxMOT | 0,68 | NS | NS | 0,56 | 0,64 |
| HOSTxVIG | NS | NS | NS | NS | 0,57 |
| MOTxVIG | 0,65 | 0,44 | 0,43 | 0,50 | 0,82 |
| Vitamina E 100µM | | | | | |
| HOSTxMOT | NS | 0,49 | 0,46 | NS | 0,56 |
| HOSTxVIG | NS | NS | NS | NS | NS |
| MOTxVIG | 0,51 | 0,56 | 0,63 | 0,72 | 0,70 |

NS = Não significativo ($P > 0,05$); MOT = Motilidade; VIG = Vigor; HOST = Teste hiposmótico; DIL = Sêmen diluído (pré-resfriado); H = Hora do TTR.

As características morfológicas do sêmen descongelado (defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais e espermatozóides normais) são apresentadas na tabela 11.

Observa-se pelos dados apresentados na tabela 11, que a adição de Vitamina E ao sêmen nas concentrações de 25µM, 50µM e 100µM não afetou as características morfológicas do sêmen descongelado.

Segundo Borges (2003) muitos trabalhos não relataram diferenças significativas na morfologia espermática entre tratamentos no sêmen criopreservado (BORGES, 2003).

Tabela 11 – Características morfológicas (defeitos menores, defeitos maiores, defeitos totais e espermatozóides normais) do sêmen descongelado (Média ± Erro-padrão):

| TRATAMENTO | DME | DMA | DFT | ESN |
|-----------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| Controle | 15,16 ± 1,31 | 6,27 ± 0,86 | 21,43 ± 1,77 | 78,57 ± 1,77 |
| Equex | 16,85 ± 1,79 | 7,76 ± 1,18 | 24,61 ± 2,49 | 75,39 ± 2,49 |
| VE 25µM | 17,02 ± 1,67 | 7,63 ± 1,29 | 24,65 ± 2,32 | 75,35 ± 2,32 |
| VE 50µM | 17,48 ± 2,27 | 5,72 ± 0,90 | 23,20 ± 2,33 | 76,80 ± 2,33 |
| VE 100µM | 13,85 ± 1,80 | 5,71 ± 0,90 | 19,56 ± 2,06 | 80,44 ± 2,06 |

P > 0,05. DME = Defeitos menores (%); DMA = Defeitos maiores (%); DFT = Defeitos Totais (%); ESN = Espermatozóides normais (%).

Segundo o CBRA (1998) o sêmen caprino descongelado não deve ultrapassar 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos totais. Todos os tratamentos se mantiveram dentro de parâmetros aceitáveis para defeitos maiores, contudo, com relação aos defeitos totais, apenas o tratamento VE 100µM apresentou média dentro dos valores preconizados.

O efeito da vitamina E nas características seminais dos mamíferos domésticos vem sendo extensivamente estudado. Duas formas de pesquisas vêm sendo empregadas. Uma delas é a adição de vitamina E à dieta dos animais com resultados benéficos em ovinos (DOKUKIN & ALYAKAEV, 1986), caprinos (ZHU et al., 2009) mas não em equinos (RICH et al., 1984). Outra forma de estudo é a adição de vitamina E em diluentes de sêmen. A adição da vitamina E aos diluentes de sêmen tem apresentado resultados variáveis entre as espécies. Em bovinos, a vitamina E não melhorou a motilidade espermática, o vigor espermático nem a integridade funcional da membrana espermática, mas melhorou a integridade da membrana dos espermatozóides quando analisados por fluorescência (BORGES, 2003). Em ovinos, Upreti et al. (1997) demonstraram que a adição de vitamina E ao diluente de sêmen não trouxe melhoras à qualidade seminal.

A pesquisa sobre a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen caprino vem apresentando resultados variáveis de acordo com o antioxidante utilizado. Segundo Bucak et al. (2009) a adição de glutamina ao diluente de sêmen caprino promove melhora da motilidade progressiva espermática e da integridade funcional da membrana espermática. A utilização de taurina, trealose e cisteína no congelamento de sêmen caprino não melhora a motilidade progressiva nem a integridade funcional da membrana espermática (ATESSAHIN et al., 2008). Castilho (2008) mostrou que a utilização de vitamina C na criopreservação de sêmen caprino não promove melhora na qualidade do sêmen descongelado e que o uso da própolis é prejudicial ao sêmen caprino.

No presente estudo verificou-se que a adição de vitamina E ao diluente de sêmen caprino não afetou a motilidade espermática, o vigor espermático nem a integridade funcional da membrana espermática.

A questão relativa à consistência da capacidade antioxidativa seguinte ao descongelamento de sêmen permanece sem resposta. Mudanças na composição do diluente com um ambiente hipertônico, concentrações dos aditivos antioxidantes e diferenças entre espécies podem explicar as diferentes reações relativas à capacidade antioxidante e porque os aditivos antioxidantes não melhoram os parâmetros de qualidade do sêmen (ATESSAHIN et al., 2008).

São requeridos estudos adicionais com maior número de animais para uma melhor compreensão das mudanças bioquímicas e obter mais informações na determinação de peroxidação lipídica e capacidades antioxidantes no sêmen caprino criopreservado.

5 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo conclui-se que a adição de Vitamina E não afetou nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.J., CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.81, p.459-469, 1987.
- AKIYAMA, M. In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. **Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi**. v.90, p.421-428, 1999.
- ALVES, S.G.G.; SNOECK, P.P.N.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; MELO, M.I.V.; HENRY, M. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro, Brasil. **Abstracts...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 508.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**. v.7, n.3, p.145-173, 1987.
- ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. **Journal of Dairy Science**. v.70, p.1664-1670, 1987.
- ARRUDA, R.P.; BARNABÉ, V.H.; ALENCAR, M.M. et al. Teste de termo-resistencia rápido: uma opção para avaliar a fertilidade do sêmen congelado bovino. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 12, Belo Horizonte, MG, 1997. **Anais...** Belo Horizonte-MG, p.178-179, 1997.
- ATESSAHIN, A.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; KIZIL, M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**. v.77, p.38-44, 2008.

- AZERÊDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**. v.41, p.257-263, 2001.
- BAKER, H.W., BRINDLE, J., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. **Fertility and Sterility**. v.65, p.411–419, 1996.
- 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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.4, n.3-4, p.7-11, 1981.
- BECONI, M.T., AFFRACHINO, M.A., SCHANG, L.M., BEORLEGNI, N.B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v.23, p.545–553, 1991.
- BENDER, D. A. **Nutritional Biochemistry of the Vitamins**. 2^a ed. University of Cambridge Press. Cambridge UK. 2003, 541p.
- BILODEAU, J.F. SUVRO-CHATTERJEE, B.; SIRARD, M.A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**. v.55, p.282-288, 2000.
- BISPO, C. A. S. **Fertilidade Do Sêmen Caprino Resfriado Ou Congelado Em Diferentes Concentrações De Gema-De-Ovo No Diluente**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Zootecnia), UFV. Viçosa, 2009.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; LIMA, M. C. C.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; BISCARDE, C. E.; LEAL, L. S.; OBA, E. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.45, n.4, p.305-312, 2008.

- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; LEANDRO, E. E. S.; GUIMARÃES, J. D. Utilização do Teste Hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**. v.6, n.3, p.213-218, 2005.
- BORGES, J.C. **Utilização de Antioxidantes Associados ou não a Emulsificante na Criopreservação do Sêmen Bovino**. 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), UFV, Viçosa, 2003.
- BREITBART H. Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. **Journal of Reproductive Immunology**. v.53, p.151–159, 2002.
- BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., SLEBODZINSKI, A.B., PIETRAS, B., WIECZOREK, G. Antioxidant effect of Vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**. v.47, p.69–74, 1995.
- BUCAK, M. N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P. B.; ULUTAS, P. A.; AKCADAG, H. I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**. v.81, p.90–95, 2009.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effect of ouabain. **Theriogenology**, v. 47, p. 765-784, 1997.
- CASTILHO, E. F. **Uso da propólis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008, 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª Ed. Belo Horizonte. 1998.

- COWAN, A. E.; MYLES, D. G. Biogenesis of surface domains during spermiogenesis in the guinea pig. **Developmental Biology**. v.155, p.124–133, 1993.
- DOKUKIN, A.P., ALYAKAEV, A.M. Vitamin E in rations for rams. **Ovtsevodstvo**. v.2, p.37-39, 1986.
- DROBNIS, E.Z., NELSON, E.A., BURRILL, M.J. Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. I. Diluent. **Journal of Animal Science Supplement**. v.51, p.439 (Abstract), 1980.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; SANTOS, A.D.F.; ROVAY, H. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.25, p.436-438, 2001.
- FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. Viçosa, 2002. 46p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2002.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ª Ed., Manole Ltda., Barueri, SP. 2004. 513p.
- HONG, Z.; HAILING, L.; HUI, M.; GUIJIE, Z. Effect of vitamin E supplementation on development of reproductive organs in Boer goat. **Animal Reproduction Science**. v.113, p.93–101, 2009.
- HONG, Z.; HAILING, L.; HUI, M.; GUIJIE, Z.; LEYAN, Y.; DUBING, Y. Effect of Vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in Boer goat. **Animal Reproduction Science**. v.117, p.90–94, 2010.
- HUNNICUTT, G. R.; KOPPEL, D. E.; MYLES, D. G. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. **Developmental Biology**. v.191, p.46–59, 1997.

- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sêmen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.70, p.219-228, 1984.
- KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Physiology of Reproduction**. 3 ed. Elsevier Academic Press USA. 2006.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, p. 1279- 1289, 1993.
- LEBOEUF, B.; RESTALL B.; SALAMON S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**. v.62, p.113–141, 2000.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier. 4ed. 2005. São Paulo.
- MAIA, M.S.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Efeito da Adição de Equex-Stm ao Diluente Tris-Gema na Motilidade do Espermatozóide Criopreservado de Carneiro. EMPARN resumos. 2007 <http://www.emparn.rn.gov.br> acessado em: 22/maio/2010.
- MARTINS, L.F. **Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça Parda Alpina**. 2001, 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), UFV. Viçosa, 2001.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**. v.42, n.1-4, p.55-65, 1996.
- McDOWELL, L. R. **Vitamins in Animal and Human Nutrition**. 2^a ed. Iowa State University Press. Iowa USA. 2000. 773p.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.1-4, 2002.

- MELO, M.I.V. de. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino**. 1999. 67p. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.
- MEMON, M.A., BRETZLAFF, K.N., OTT, R.S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**. v.46, p.473–475, 1985.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. 6ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.
- MIZUTANI, T.; SUMIGAMA, S.; NAGAKUBO, K.; SHIMIZU, N.; OBA, H.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Usefulness of Addition of Orvus ES Paste and Sodium Lauryl Sulfate to Frozen Feline Semen. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.72, p.23–27, 2010.
- MUNNE-BOSC, S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. (Special issue: Vitamin E in plants, man and animals). **Journal of Plant Physiology**. v.162, p.743–748, 2005.
- NEILD, D.N.; GADELLA, B.M.; AGÜERO, A.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**. v.89, p.47–56, 2005.
- NUNES, J.F., CORTEEL, J.M., COMBARNOUS, Y., BARIL, G. Role du plasma sèminal dans la survie in vitro des spermatozöids de bouc. **Reproduction Nutrition Développement**. v.22, p.611–620, 1982.
- OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; KROTH, E.; LARA, G. SMIDERIE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.

- PALHÃO, M. P. **Avaliação do sêmen caprino diluído em citrato-gema, resfriado e armazenado a 5 °C por 24 horas.** 2006, 81 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), UFV. Viçosa, 2006.
- PURDY P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research.** v.63, p.215–225, 2006.
- PURSEL V. G.; SCHULMAN; L. L.; JOHNSON, L. A. Effect of Orvus ES Paste on Acrosome Morphology, Motility and Fertilizing Capacity of Frozen-Thawed Boar Sperm. **Journal of Animal Science.** v.47, p.198-202, 1978.
- REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science.** v.36, p.77-86, 1994.
- RICH, G.A., MCCLOTHLIN, D.E., LEWIS, L.D., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W. Effect of vitamin E supplementation on stallion seminal characteristics and sexual behaviour. **Proceedings**, 10th International Congress Animal Production. Artificial Insemination. Abstract v.11, p.163, 1984.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology.** v.68, p.138–146, 2007.
- ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.
- ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MONTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.
- ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozóides de caprinos.** 2006, 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), UFV. Viçosa, 2006.

- ROY, A. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature London**. v.179, p.318, 1957.
- SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M; PALÁCIO, A.R.S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, 2003.
- SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.159-167. 2008.
- SANTOS, A.D.F; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; ROVAY, H.; GORETTI, R.G.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.
- SANTOS, A. D. F.; CIRO TORRES, A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A. M.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.5, p.1934-1942, 2006.
- SIKKA, S.C., RAJASEKARAN, M., HELLSTROM, W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**. v.16, p.464-468, 1995.
- SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO V. A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.2, p.452-456, 2006.
- SINCLAIR, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. **Alternative Medicine Review**. v.5, p.28-38, 2000.

- SMITH, C. Use of embryo transfer in genetic improvements of sheep. **Animal Production**. v.42, p.81-88, 1986.
- SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade**. 2003, 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.
- 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 SE LÍNGUA PORTUGUESA”, Vale de Santarém. **Anais...** Vale de Santarém, 2000. p.87.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; Mc CUE, P.M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. 80p. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, Bulletin. n.9. 1999.
- SURAI, P.,KOSTJUK, I.,WISHART, G., MACPHERSON, A., SPEAKE, B., NOBLE, R., IONOV, I.,KUTZ, E. Effect of Vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Element Research**. v.64, p.119–132, 1998.
- TEMPLE, N.J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research**. v.20, p.449–459, 2000.
- THA, D. D. Artificial insemination and freezing goat semen – new techniques in Vietnam. **Goat and Rabbit Research Center**, Sontay, Hatay, Vietnam, 2005.
- TOSHIMORI, K. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. **Cell and Tissue Research**. v.293, p.177–187, 1998.

- TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; KOMORIYA, K.; SHIMIZU, N.; NAGAKUBO, K.; KAWAKAMI, E. Effect of Addition of Orvus ES Paste to Frozen Canine Semen Extender on Sperm Acrosomes. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.62, p.537–538, 2000.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**. v.48, p.269-278, 1997.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction and Fertility Development**. v.9, p.321-331, 1997.
- WITTE, T.S.; SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.102, p.181–193, 2007.
- YOUSEF, M.I. ABDALLAH, G.A. KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**. v.76, p.99–111, 2003.
- ZALATA, A.A.; DEPUYDT, C.E. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v.21, p.154-162, 1998.
- ZHU, H., LUO, H.L., MENG, H., ZHANG, G.J. Effect of Vitamin E supplementation on development of reproductive organs in Boer goat. **Animal Reproduction Science**. v.113, p.93–101, 2009.