

## Aspectos críticos da congelação do sêmen caprino

*Critic aspects of the goat semen cryopresevation*

Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>1</sup>, Andréia Fernandes de Souza<sup>2</sup>, Adriana Trindade Soares<sup>1</sup>,  
Clarissa Neuman Ramos César<sup>1</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>1</sup>, André Mariano Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia (DMV/UFRPE), Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Imonopatologia Keizo Azami (LIKA/UFPE), Recife, PE, Brasil

E-mail: [mpguerra@dmv.ufrpe.br](mailto:mpguerra@dmv.ufrpe.br)

### Resumo

Esta revisão teve como objetivo abordar os principais fatores que podem interferir no sucesso da congelação do sêmen caprino, como variação individual, estacionalidade reprodutiva, centrifugação para retirada do plasma seminal, adição de diluentes e crioprotetores, e curva de refrigeração, visando aumentar o conhecimento das necessidades destas células durante o processo de congelação e possibilitar o desenvolvimento de protocolos de congelação mais eficientes.

**Palavras-chave:** Congelação, viabilidade, espermatozóide, caprino.

### Abstract

*This review had the objective to discuss the main factors that can interfere on the success of the goat semen frozen, like as individual variation, reproductive seasonality, centrifugation to take off the seminal plasma, the diluent and cryoprotector addition, and cool curve, aiming to increase the knowledge of the necessities of these cells during the freezing process and to possibility the development of the freezing protocols more efficient.*

**Keywords:** Freeze, viability, sperm, goat.

### Introdução

O armazenamento do sêmen, particularmente em estado congelado, ocasiona danos ultra-estruturais, químicos e funcionais aos espermatozóides, determinando redução na motilidade, na viabilidade e na fertilidade (Leboeuf *et al.*, 2000). No entanto, a ocorrência destes danos depende de características de cada espécie, uma vez que, segundo Byrne *et al.* (2000), os espermatozóides de bovinos e caprinos são menos sensíveis à congelação do que os de ovino, principalmente quando submetidos à temperatura de -10 e -25 °C.

Os danos físicos que acometem os espermatozóides durante o processo de congelação podem se localizar nas membranas plasmática e acrossomal, na peça intermediária ou no axonema, apesar de as membranas serem mais sensíveis do que o núcleo e a cauda do espermatozóide (Salamon e Maxwell, 1995). Segundo Purdy (2006), a ocorrência destes danos difere entre as espécies em virtude dos espermatozóides possuírem tamanhos e formas diferentes, como também sua composição de lipídeos.

Ressalta-se, entretanto, que a presença da enzima fosfolipase A no plasma seminal de caprinos compromete a fertilidade do sêmen durante o processo de congelação (Roy, 1957). Assim, visando obter maior viabilidade dos espermatozóides, pós-descongelação, alguns autores utilizam a lavagem do sêmen. Todavia, este procedimento tem sido motivo de várias pesquisas, tendo sido questionada não somente a técnica de centrifugação, como também o número de lavagens e a diluição do sêmen (Roy, 1957).

Por conseguinte, ao se realizar o processo de criopreservação do sêmen caprino deve-se levar em consideração características inerentes a esta espécie. Desta forma, objetivou-se com este trabalho abordar os fatores que podem interferir no sucesso da congelação do sêmen caprino, como variação individual, estacionalidade reprodutiva, centrifugação para retirada do plasma seminal, adição de diluentes e crioprotetores, concentração espermática por palheta e curva de congelação.

### Fator individual

A influência do fator individual tem sido avaliada por vários autores, visando analisar a capacidade de criopreservação espermática, tendo sido enfatizada a necessidade de avaliação prévia tanto do reprodutor quanto de diferentes ejaculados de um mesmo animal (Cochran *et al.*, 1985; Mies Filho *et al.*, 1986; Windsor, 1997).

Evidências observadas em várias espécies de mamíferos têm sugerido que machos de uma mesma espécie diferem em sua fertilidade, podendo variar de inférteis a altamente férteis (Killian *et al.*, 1999). Assim, com base na viabilidade das amostras de sêmen criopreservadas, Cano (1984) classificou os reprodutores como de alta e baixa sensibilidade ao processo de congelação. No entanto, apesar de esta classificação ser independente da qualidade do sêmen *in natura* (Corteel *et al.*, 1987), sabe-se que os espermatozoides adquirem sensibilidade ao choque térmico durante o trânsito no ducto epididimário, provavelmente devido à alteração na composição dos lipídeos presentes na membrana espermática (Watson, 1981).

Diferenças na frequência de ejaculação (Boué e Corteel, 1992) ou no tempo do trânsito epididimário, determinando heterogeneidade na população espermática presente no epidídimo, podem desenvolver um mecanismo responsável pela variabilidade da resposta à variação de temperatura, explicando porque ejaculados de um mesmo indivíduo podem variar em sua resposta ao processo de congelação/descongelação (Watson, 1995).

### Época do ano

Na espécie caprina, alguns trabalhos apresentam resultados contraditórios na congelabilidade e na fertilidade de amostras de sêmen obtidas nas estações reprodutivas e não reprodutivas. Todavia, em animais criados em regiões de clima temperado, sugere-se que a fertilidade de espermatozoides após o processo de congelação (Corteel *et al.*, 1978; Muhuyi *et al.*, 1992; Karatzas *et al.*, 1997) são maiores quando as colheitas das amostras de sêmen são realizadas na estação reprodutiva, quando comparada à não reprodutiva.

Ahmed *et al.* (1997) observaram diferença na viabilidade de espermatozoides congelados, obtidos de caprinos criados no Sudão, de acordo com a estação do ano, e relataram que o aumento das anormalidades observadas após a congelação de amostras colhidas no verão, como elevado porcentual de caudas enroladas, deve estar relacionado ao estresse térmico. Desta forma, estes autores sugeriram colher e congelar amostras de sêmen de reprodutores caprinos durante a estação reprodutiva (agosto a fevereiro), visando obter um banco de sêmen para realização das IA durante todo o ano.

Esta variação na congelabilidade de amostras de sêmen caprino pode estar relacionada ao fato da influência sazonal interferir na produção das proteínas espermáticas, uma vez que, segundo Smith *et al.* (1999), devido à diminuição do volume seminal e da concentração de espermatozoides, algumas proteínas presentes na estação reprodutiva (peso molecular 20 – 70 kDa) encontram-se ausentes na estação não reprodutiva.

### Centrifugação

Apesar de indicada no processo de congelação do sêmen caprino, alguns autores (Ritar e Salamon, 1982; Evans e Maxwell, 1987) não recomendam a retirada do plasma seminal, em virtude desse procedimento prejudicar a viabilidade das células espermáticas e, conseqüentemente, as taxas de fertilidade após as inseminações, provavelmente devido ao efeito da centrifugação sobre a viabilidade das células espermáticas (Barbosa *et al.*, 1999).

Todavia, geralmente realiza-se uma ou duas lavagens (550-950 x G, 10 a 15 minutos) das células espermáticas no processo de congelação do sêmen caprino (Nunes *et al.*, 1982; Ritar e Salamon, 1982). Acredita-se que, quando realizada de forma inapropriada, a centrifugação danifica as células espermáticas, mas quando realizada corretamente determina benefícios ao processo de criopreservação da célula e melhora nas taxas de motilidade, em virtude de se obter maior porcentagem de células vivas e com acrossomas íntegros, pós-descongelação (Drobnis *et al.*, 1980; Ritar e Salamon, 1982; Memon *et al.*, 1985; Leboeuf *et al.*, 2000) ou refrigeração a 5°C durante 72h (Islam *et al.*, 2006).

Segundo Islam *et al.* (2006), a manutenção de amostras de sêmen caprino à temperatura ambiente antes da lavagem causou mais danos aos espermatozoides, enquanto a lavagem imediata determinou efeito benéfico na viabilidade dos espermatozoides armazenados por até 72 horas, à temperatura de refrigeração (5°C).

Apesar de muitos autores corroborarem que a remoção do plasma seminal de amostras de sêmen caprino, ressalta-se que este procedimento é favorável quando se usa diluidores à base de gema de ovo, em virtude de preservar a motilidade das células espermáticas no sêmen fresco e no congelado com plasma seminal (Azeredo *et al.*, 2001). Todavia, quando o plasma seminal é retirado ocorre aumento do porcentual de membranas danificadas pós-descongelação. Estes achados podem ser explicados pelo fato de o experimento ter sido realizado no período reprodutivo, havendo interferência positiva do fotoperíodo, uma vez que, segundo Corteel *et al.* (1980), apesar do efeito favorável ou não que a lavagem proporciona ao ejaculado, existem diferenças entre as colheitas de sêmen durante as estações, uma vez que as células suportam melhor o processo de congelação durante a estação reprodutiva.

### Retirada do plasma seminal

As características bioquímicas do plasma seminal dos ejaculados variam devido a diferenças nas

proporções de secreções provenientes das glândulas acessórias. Esta alteração no ambiente bioquímico dos ejaculados pode modificar a resposta celular após a criopreservação, tendo sido proposta também como fonte de variação da fertilidade (Windsor, 1997).

Na espécie caprina, o plasma seminal exerce efeito nocivo sobre a célula espermática, em virtude da presença da enzima fosfolipase A, secretada pelas glândulas bulbouretrais, que interage com os fosfolípidios presentes no leite (Corteel, 1974; Nunes, 1982) ou na gema de ovo (Roy, 1957), resultando em lisolecitinas e ácidos graxos, substâncias tóxicas aos espermatozoides (Corteel, 1974).

Em contrapartida, Nunes *et al.* (1982) relataram aspectos positivos da presença do plasma seminal na sobrevivência de espermatozoides submetidos à congelação, o que foi ratificado por Azeredo *et al.* (2001), ao constatarem que a remoção do plasma seminal reduziu a motilidade e o vigor espermáticos de amostras congeladas de sêmen caprino. Segundo Misra *et al.* (1993), o uso de soluções estabilizantes isotônicas melhoram a qualidade espermática do sêmen caprino em diversas temperaturas.

A capacidade da lisolecitina em fusionar membranas encontra-se bem estabelecida. Estudos morfológicos mostram que o tratamento dos espermatozoides com lisolecitinas induz a fusão da membrana acrossomal com a membrana plasmática e conseqüente reação acrossomal. Por conseguinte, é importante ressaltar que o glicerol, na concentração de 20%, impede a desnaturação da fosfolipase à temperatura de 70°C. Porém, quando adicionado junto a inibidores da fosfolipase e armazenado a -20°C, em solução contendo o substrato para enzima, potencializa a ação do inibidor (Upreti *et al.*, 1999).

### Proteínas seminais

As proteínas presentes no plasma seminal variam entre as espécies (Villemure *et al.*, 2003), atuando na viabilidade, na motilidade espermática e na capacidade fertilizante da célula espermática (Brandon *et al.*, 1999; Sanchez-Luengo *et al.*, 2004).

De acordo com Therien *et al.* (1999), as proteínas do plasma seminal de bovino (BSPs) se associam à membrana dos espermatozoides no momento da ejaculação, induzindo o efluxo de colesterol e fosfolípidios da membrana espermática, o que pode induzir a desestabilização da mesma, diminuindo sua estabilidade frente aos processos de criopreservação de sêmen utilizados atualmente.

O processo de criopreservação induz mudanças na organização lipídica da membrana, com conseqüente modificação nas proteínas cinéticas das enzimas intramembranas. Assim, a fusogenicidade e a resposta do sinal de transdução podem ser afetadas por estas mudanças, contribuindo com a possibilidade de que a longevidade do sêmen descongelado seja reduzida em virtude da precoce capacitação espermática (Holt e North, 1984, 1986; Drobnis *et al.*, 1993).

Sundhey *et al.* (1995) concluíram que a concentração das proteínas presentes na membrana da cauda do espermatozoide caprino aumentava durante a maturação epididimal e possuíam pesos moleculares menores de 25,7 kDa e maiores de 170 kDa, especialmente as proteínas de 220 kDa, que possivelmente estão associadas à capacitação espermática, migração do espermatozoide no útero, ligação do espermatozoide ao ovulo, fertilização e divisão do ovócito. Este fato provavelmente explica as afirmações de Parks e Graham (1992), ao relatarem que a compartimentalização da membrana decorre de vários fatores e que alterações estruturais das proteínas podem ser induzidas pela criopreservação, reduzindo a capacidade fertilizante dos espermatozoides.

Trabalhando com animais de diferentes graus de congelabilidade do sêmen, Roncoleta (1999) evidenciou que algumas proteínas podem participar de forma positiva ou negativa no metabolismo espermático durante a criopreservação.

Ao pesquisarem as proteínas do plasma seminal dos caprinos criados em clima subtropical úmido, La Falci *et al.* (2002) observaram que as proteínas com afinidade para heparina (HAPs) estão sob controle estacional e diretamente relacionadas à função espermática durante a estação reprodutiva e não reprodutiva, como, por exemplo aquelas responsáveis pelo processo de capacitação e fertilização (Desnoyers e Manjunath, 1992; Sanz *et al.*, 1993).

Em caprinos da raça Alpina Americana criados na região Nordeste do Brasil, foi observada melhor qualidade espermática quando o sêmen foi colhido no período de alto índice pluviométrico, o que pode ser atribuído à presença das proteínas de 13 kDa e 45 kDa (Souza *et al.*, 2009b), enquanto que no período de baixo índice pluviométrico encontrou-se maior diversidade de proteínas de membranas espermáticas (30) do que no período de alto índice pluviométrico (26), sem interferir na viabilidade espermática (Souza *et al.*, 2009a).

### Diluentes

Os diluentes destinam-se a prolongar a vida fértil dos espermatozoides e protegê-los de condições ambientais desfavoráveis (Picket e Amann, 1987), sendo mais utilizados para a criopreservação do sêmen caprino o diluidor à base de leite desnatado (Voss e Pickett, 1976). Todavia, por ser rico em fosfolípidios, este diluente deve ser submetido ao processo de aquecimento a 95 °C, durante 10 minutos, com o objetivo de inativar os fosfolípidios e proporcionar melhor recuperação da motilidade progressiva dos espermatozoides (Trejo *et al.*,

1987).

Alguns estudos têm proposto que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) encontradas na gema de ovo podem ser responsáveis pela resistência ao choque térmico e pelo aumento da motilidade espermática após a descongelação (Moussa *et al.*, 2002), em virtude de promover a entrada de fosfolípido e colesterol para a membrana e prevenir a saída destes compostos da membrana espermática, formando um complexo com as proteínas do plasma seminal e impedindo que estas proteínas fiquem disponíveis para atuar na membrana espermática. Com isto, evita-se o efluxo de fosfolípidios e colesterol, conferindo à célula espermática maior resistência ao choque térmico (Manjunath *et al.*, 2002; Bergerom *et al.*, 2004).

Na espécie caprina, o uso do diluente é determinante para o sucesso de congelação do sêmen. Uma das alternativas para se minimizar os problemas relacionados ao processamento do sêmen é o uso de diluidores que protegem as células espermáticas sem danificá-las e que prolonguem a vida fértil dos espermatozoides (Picket e Amann, 1987).

A água de coco também tem sido utilizada como excelente diluidor para o sêmen de caprinos, devido à presença de uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, conhecido como ácido 3-indol-acético, que confere aos espermatozoides aumento na motilidade e no vigor espermático (Sales, 1989). Além disso, este diluente possui na sua composição aminoácidos, açúcares, vitaminas e minerais. Este autor também relata que, devido à baixa concentração de fosfolípidios, a água de coco não se apresenta favorável como diluente na congelação do sêmen, porém quando utilizada para refrigeração, deve ser acrescida de 3% de gema de ovo (Figueiredo *et al.*, 2002).

Recentemente, visando avaliar a viabilidade espermática de amostras de sêmen caprino, sem centrifugação, diluído e armazenado à temperatura ambiente durante 28 horas em leite desnatado, Laiciphos<sup>®</sup>, Beltsville Thawing Solution e Biociphos Plus<sup>®</sup>, e Biociphos Plus<sup>®</sup> após armazenamento a 5 °C, Paulenz *et al.* (2005) observaram que os diluidores à base de leite desnatado, especialmente o Laiciphos<sup>®</sup>, preservou a motilidade e a integridade do acrossoma melhor do que o Biociphos Plus<sup>®</sup>, quando as amostras de sêmen caprino foram armazenadas a 20°C, durante 28 horas. Desta forma, segundo estes autores, ao utilizar os diluentes Biociphos Plus<sup>®</sup> ou outro diluente contendo lipídeos de origem vegetal, mas sem glicerol, pode ser uma alternativa viável para o armazenamento de sêmen caprino a 5°C. Todavia, estes autores não realizaram a avaliação *in vivo* destas amostras criopreservadas.

Ressalta-se também a adição de antibiótico (penicilina e gentamicina) ao diluente conforme foi avaliado por Souza *et al.* (2006), onde observaram não haver diferença entre os diferentes tipos de antibióticos adicionados ao leite desnatado, mas evidenciaram que as amostras de sêmen de caprino apresentaram resistência à penicilina e estreptomicina, associação amplamente utilizada nos diluidores de sêmen. Desta forma, estes autores sugeriram o uso da gentamicina como alternativa para o controle efetivo de microorganismos nas amostras de sêmen caprino.

Atualmente tem sido testado o efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na viabilidade de amostras de sêmen submetidas ao procedimento de criopreservação (Guerra *et al.*, 2004). No entanto, César (2008), utilizando diluente Tris-leite, observou que o uso de Catalase (600, 800 e 1000 U/mL) ou Superóxido dismutase (600 U/mL e 800 U/mL), não aumentaram a viabilidade de espermatozoides criopreservados de caprinos.

### **Crioprotetor**

De acordo com Evans e Maxwell (1987), na composição do meio diluidor utilizado para congelar amostras de sêmen caprino devem estar presentes um crioprotetor não penetrante (gema de ovo ou leite), um crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfoxido), um estabilizante (Tris ou teste), um ou mais açúcares (glucose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina).

Tradicionalmente, a adição de glicerol é realizada antes da congelação, momento em que o mesmo penetra nas células, visando estabilizar as concentrações intra e extracelulares. Todavia, alguns autores têm evidenciado que este crioprotetor determina alterações na estrutura e na integridade bioquímica dos espermatozoides, acelerando a reação acrossomal (Salamon e Maxwell, 2000). Por conseguinte, a sobrevivência da célula após a descongelação é influenciada pelo modo que o glicerol é adicionado ao diluente antes da congelação (Fiser e Fairfull, 1989).

No entanto, Souza *et al.* (2002) pesquisaram o efeito da adição de glicerol e etileno glicol, como crioprotetores do sêmen de caprinos, tendo relatado que o glicerol determina melhor viabilidade dos espermatozoides, pós-descongelação.

### **Temperatura de refrigeração**

Durante o processo de criopreservação, a ocorrência dos danos celulares tem início na fase de refrigeração do espermatozoide, onde a redução brusca de temperatura é uma das causas de morte celular (Watson, 1981). Desta forma, aconselha-se o uso da refrigeração lenta, em virtude de possibilitar que a água saia da célula por

osmose e impeça a formação de cristais de gelo, minimizando os danos celulares (Watson, 2000). No entanto, o estresse ocasionado pelo processo de refrigeração não impede a ocorrência de danos à membrana, provavelmente devido à mudança da fase dos lipídeos e do estado funcional das membranas (Watson, 1981), assim como também da presença de outros elementos, principalmente as proteínas (Robertson *et al.*, 1988).

A instabilidade da membrana plasmática do espermatozóide submetido a variações térmicas durante o processo de criopreservação aumenta a permeabilidade desta estrutura, com perda de moléculas e íons intracelulares ou adsorção de componentes do meio diluidor (Barbosa *et al.*, 1999).

A temperatura inicial de congelação também é capaz de influenciar as características espermáticas pós-descongelação. Desta forma, segundo Bag *et al.* (2002), a manutenção dos espermatozóides à temperatura de  $-125^{\circ}\text{C}$ , antes de sua imersão em nitrogênio líquido, determina efeito significativamente positivo na motilidade e na velocidade dos espermatozóides criopreservados, bem como na integridade da membrana plasmática, quando comparada às temperaturas de  $-25$  e  $-75^{\circ}\text{C}$ .

Algumas espécies apresentam maior sensibilidade espermática à criopreservação. Assim, na tentativa de determinar a interferência de diferentes velocidades de congelação durante o intervalo de 5 a  $-25^{\circ}\text{C}$ , bem como sua influência na fecundação *in vivo* e *in vitro* do sêmen, Byrne *et al.* (2000) utilizaram dois protocolos de congelação. O método rápido, com decréscimo de  $5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  que apresenta melhor taxa de clivagem e formação de blastocistos a partir de ovócitos maturados e fecundados *in vitro*; e o método lento, com decréscimo de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , seguido de I.A. transcervical e intra-uterina por via laparoscópica. Em ambos os grupos, os índices de fertilidade foram superiores nas fêmeas inseminadas com sêmen proveniente do processo de congelação rápida.

### Danos espermáticos causados pela congelação

Os danos ultra-estruturais dos espermatozóides ocorridos durante a congelação são acompanhados por mudanças bioquímicas e perdas de substâncias vitais, como transaminase glutâmico oxalacética (TGO), proteínas e aminoácidos, decréscimo na atividade da fosfatase, aumento na concentração de sódio e diminuição de potássio, inativação de hialuronidase e outras enzimas, perda de prostaglandinas, redução da síntese de ATP e ADP, bem como da atividade proteolítica acrossomal (Salamon e Maxwell, 1995).

De Leeuw *et al.* (1990) citaram vários fatores que podem influenciar no comportamento das membranas celulares frente a alterações de temperatura e do meio, tendo ressaltado que a elevada concentração de proteínas na membrana pode aumentar a estabilidade da membrana, diminuindo as chances de alterações induzidas pela refrigeração.

A estrutura da membrana espermática varia de acordo com sua localização, sendo compartimentalizada de diferentes formas, dependendo da região espermática que ela reveste. Cada compartimento exhibe propriedades físicas e químicas diferentes (Squires *et al.*, 1999). Desta forma, a membrana plasmática possui acentuada organização de domínio com muitas glicoproteínas antigênicas segregadas nas regiões acrossomal, pós-acrossomal, peça intermediária e peça principal (Holt e North, 1984).

Segundo Wolf *et al.* (1998), a coexistência de uma fase de domínio lipídico fluida e gel na membrana espermática, induzida por sua variada localização, podem ser exacerbados durante a refrigeração espermática. Múltiplas variações de temperatura determinam alterações na estrutura da membrana plasmática tornando-a um mosaico de gel e fases fluidas, tendo sido sugerido que esteja relacionada à afinidade preferencial a certos lipídios de glicoproteínas transmembranosas, através do efeito de modulação do colesterol ou da presença de barreiras intramembranas que impedem a difusão livre (Cardullo e Wolfe, 1990).

Além da motilidade, vários parâmetros da morfologia espermática são afetados pela congelação, como por exemplo o aumento do percentual de células com acrossoma reagido (Valcarcel *et al.*, 1994). A redução na porcentagem de gametas morfológicamente normais tem sido correlacionado com baixa fertilidade de amostras de sêmen congeladas em caprinos (Chandler *et al.*, 1988). No entanto, a análise computadorizada da morfologia espermática (ASMA) realizada por Gravance *et al.* (1997) evidenciou que a congelação de espermatozóides caprinos não afeta a morfometria da cabeça.

### Considerações finais

Apesar de bastante estudado, o procedimento de congelação de sêmen caprino possui ainda alguns aspectos considerados críticos à viabilidade da célula espermática, pós-descongelação, reduzindo a capacidade fertilizante deste gameta. Todavia, pesquisas mais específicas da fisiologia espermática aumentarão o conhecimento das necessidades destas células durante a congelação e possibilitarão o desenvolvimento de protocolos de congelação mais eficientes.

### Referências

Ahmed MMM, Makawi AS, Gadir AA. Reproductive performance of Saanen bucks under tropical climate.

*Small Rumin Res*, v.26, p.151-155, 1997.

**Azeredo GA, Esper CR, Resende KT.** Evaluation of plasma membrane integrity of frozen thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin Res*, v.41, p.257-263, 2001.

**Bag S, Joshi A, Rawat PS, Mittal JP.** Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Rumin Res*, v.43, p.23-29, 2002.

**Barbosa LP, Guimarães JD, Espescht CJB, Torres CAA, Santos ADF.** Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programa de inseminação artificial em cabras alpinas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.283-285, 1999.

**Bergeron A, Boisvert M, Manjunath P.** Comparative study on the phospholipids-binding proteins in seminal plasma of different species. In: International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro, BA, Brazil. *Abstracts...* Porto Seguro: ICAR, 2004. p.226.

**Boué P, Corteel JM.** Aptitude of male goat sperm to withstand freezing: combined effects of season and time of sexual rest between two successive semen collections. In: Lokeshwar RR (Ed.). *Recent advances in goat production*. New Delhi: Nutan Printers, 1992. v.2, p.1042-1045. (Proceedings of the International Conference on Goats, 5, 1992, New Delhi).

**Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayer-Hosken RA.** Twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, v.52, p.863-873, 1999.

**Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP.** Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vitro and in vivo. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.265-275, 2000.

**Cano EA.** Inseminación con semen congelado de carnero. In: Internacional Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 10, 1984, Urbana-Champaign. *Proceedings...* Urbana-Champaign: ICAR, 1984. v.2, p.10.

**Cardullo RA, Wolfe DE.** *The sperm plasma membrane. A little more than mosaic, a little less than fluid*. New York: Plenum Press, 1990. p.305-336.

**César CNR.** *Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na viabilidade in vitro do sêmen criopreservado de caprinos*. 2008. 28f. Monografia - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

**Chandler JE, Painter CL, Adkinson RW, Hoyt PG.** Semen quality characteristics of dairy goats. *J Dairy Sci*, v.71, p.1638-1646, 1988.

**Cochran RC, Judy JK, Parker CF, Hallford DM.** Pre-freezing and post-thaw semen characteristics on five ram breeders collect by electroejaculation. *Theriogenology*, v.23, p.431-434, 1985.

**Corteel JM.** Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect. *Anim Biochem Biophys*, v.14, p.741-745, 1974.

**Corteel JM, Baril G, Leboeuf B.** Development and application of artificial insemination with deep frozen semen and out-of season breeding of goats in France. In: International Conference on Goats, 4, 1987, Brasília. Brazil. *Proceedings...* Brasília: ICG, 1987. v.1, p.523-547.

**Corteel JM, Baril G, Leboeuf B.** Residual seasonal variations in fertility in selected deep-frozen ejaculates of European dairy male goats. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 9, 1980, Madrid. *Proceedings...* Madrid: ICAR, 1980. v.5, p.422-425.

**Corteel JM, Baril G, Leboeuf B, Marcellier N.** Voies disponibles pour augmenter l'utilisation des meilleurs boucs. In: Journées Recherche Ovine et Caprine, 4, 1978, Paris. Paris: INRA-ITOVIC, 1978. p.358-366.

**De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.

**Desnoyers L, Manjunath P.** Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem*, v.267, p.10149-10155, 1992.

**Drobnis EZ, Crowie LM, Berger T, Anchoodoguy TJ, Overstreet JW, Crowie JH.** Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool*, v.265, p.432-437, 1993.

**Drobnis EZ, Nelson EA, Burrill MJ.** Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. I. Diluent. *J Anim Sci*, suppl.51, p.439, 1980. (Abstract).

**Evans G, Maxwell WMC.** Frozen storage of semen. In: Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Wellington: Butterworths, 1987. p.122-141.

**Fiser PS, Fairfull RW.** The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v.26, p.64-69, 1989.

**Figueiredo EL, Nunes JF, Campos AWU, Silva Filho AHS.** Viabilidade *in vitro* do sêmen caprino Saanem diluído em água de coco a 4°C. *Ciênc Vet Trop*, v.5, p.31-38, 2002.

**Gravance CG, Whitw C, Robertson KR, Champion ZJ, Casey PJ.** The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Anim Reprod Sci*, v.49, p.37-43, 1997.

**Guerra MMP, Evans G, Maxwell WMC.** Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de literatura). *Rev Bras Reprod Anim*, v.28, p.187-195, 2004.

- Holt WV, North RD.** Partially irreversible cold-induced lipid phase transition in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J Exp Zool*, v.87, p.230-473, 1984.
- Holt WV, North RD.** Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.78, p.447-57, 1986.
- Islam R, Ahmed K, Deka BC.** Effect of holding and washing on the quality of goat semen. *Small Rumin Res*, v.66, p.51-57, 2006.
- Karatzas G, Karagiannidis A, Varsakeli S, Brikas P.** Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, v.48, p.1049-1059, 1997.
- Killian GJ, Chapman DA, Cancel AM, Gerena RL, Rodriguez CM, Day JR.** Male factors affecting sperm fertility. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.83-85, 1999.
- La Falci VSN, Tortorella H, Rodrigues BA.** Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, v.57, p.1035-1048, 2002.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141, 2000.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M.** Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod*, v.67, p.1250-1258, 2002.
- Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS.** Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am J Vet Res*, v.46, p.473-475, 1985.
- Mies Filho A, Jobim MIM, Endler JO, Ward VB, Duarte MMB, Souza JAC, Martins SCR.** Estudo sobre inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos no Rio Grande do Sul. *Rev Bras Reprod Anim*, v.10, p.235-245, 1986.
- Misra DN, Deka BC, Borgohain BN.** Effect of washing on the quality of goat semen during preservation at +5°C. *Indian J Anim Reprod*, v.14, p.49-50, 1993.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M.** Low density lipoprotein extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- Muhuyi EZ, Drobnis EZ, Nelxon EA, Lin TY.** Season, breed and age influence on production and freezability of dairy goat semen. In: International Conference on Goat Disease, 3, 1992, Tucson. *Proceedings...* Tucson: ICGD, 1992. p.283.
- Nunes JF.** *Fisiologia sexual do macho caprino*. Sobral: EMBRAPA/CNPC, 1982. 41p. (Circular técnica, 5).
- Nunes JF, Corteel JM, Combarous Y, Baril G.** Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reprod Nutr Dev*, v.22, p.611-620, 1982.
- Parks JE, Graham JK.** Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- Paulenz H, Soltun K, Adnøy T, Andersen Berg K, Söderquist L.** Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. *Small Rumin Res*, v.59, p.89-94, 2005.
- Pickett BW, Amann RP.** *Extension and storage of stallion spermatozoa: a review*. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.289-302, 1987.
- Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225, 2006.
- Ritar AJ, Salamon S.** Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust J Biol Sci*, v.35, p.305-312, 1982.
- Robertson L, Watson PF, Plummer JM.** Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Lett*, v.9, p.286-293, 1988.
- Roncoleta MI.** *Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros*. 1999.104f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estadual Paulista, FCVAJ, Jaboticabal, 1999.
- Roy A.** Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, v.179, p.318-319, 1957.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Frozen storage of ram semen insemination processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination.(review). *Anim Reprod Sci*, v.37, p.185-249, 1995.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.
- Sales MGF.** *Água de côco (Cocos nucifera) in natura e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor de sêmen caprino*. 1989. 176f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.
- Sanchez-Luengo S, Aumuller G, Albrecht M, Sem PC, Rohm KH, Wilhelm B.** Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Androl*, v.25, p.234-244, 2004.
- Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius HJ, Topfer-Petersen E.** Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev*, v.35, p.37-43, 1993.
- Smith JF, Parr J, Murray GR, McDonald RM, Lee RSF.** Seasonal changes in the protein content and



- composition of ram seminal plasma. *Proc N Zeal Soc Anim Prod*, v.59, p.223-225, 1999.
- Souza AF, Coletto ZF, Batista AM, Guerra MMP.** Proteínas de membranas obtidas nos períodos de alto (AIP) e baixo (BIP) índice pluviométrico associadas à viabilidade de espermatozoides caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte. *Anais.*, Belo Horizonte: CBRA, 2009a. CD-ROM.
- Souza AF, Guerra MMP, Batista AM, Mergulhão FCC, Neves AC, Wischral A.** Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. *Rev Bras Reprod Anim Supl.*, n.5, p.103-105, 2002.
- Souza AF, Guerra MMP, Coletto ZF, Mota RA, Silva LBG, Leão AEDS, Nascimento Sobrinho EL.** Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.43, p.329-336, 2006.
- Souza AF, Leitão MCG, Batista AM, Porto ALF, Lima Filho JL, Guerra MMP.** Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. *Ciênc Rural*, v.39, 2009b. online. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a150cr1026.pdf>.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE.** *Cooled and frozen stallion semen.* Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1999. 39p. (Bulletin, n.9)
- Sundhey R, Ahuja TSP, Singhb B.** Changes in the membrane proteins of buck (*Capra hircus*) spermatozoa during epididymal maturation. *Small RumRes*, v.16, p.251-261, 1995.
- Thérien 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.
- Trejo A, Peralta M, Castro O.** Frozen caprine semen in tris-egg yolk-based extenders. In: International Conference on Goat, 4, Brasília, DF, Brazil. *Proceedings...* Brasília: EMBRAPA/DDT, 1987. v.2, p.1499-1500.
- Upreti GC, Hall EL, Koppens D, Oliver JE, Vishwanath R.** Studies on the measurement of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and PLA<sub>2</sub> inhibitor activities in ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.107-121, 1999.
- Valcárcel A, De Las Heras MA, Pérez L, Moses DF, Baldassarre H.** Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and postthaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.41, p.483-489, 1994.
- Villemure M, Lazure C, Manjunath P.** Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.39-41, 2003.
- Voss JL, Pickett BW.** Reproductive management of the brood mare. Fort Collins: Colorado State University, in co-operation with Animal Reproduction Laboratory, 1976. 29p. (General Series, 961)
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved Semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.
- Watson PF.** The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clarke A (Ed.) *The effects of low temperatures on biological membranes.* London: Academic Press, 1981. p.189-218.
- Windsor DP.** Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination on Merino ewes. *Anim Reprod Sci*, v.47, p.21-29, 1997.
- Wolf CA, James PS, Mackie AR, Ladha S, Jones R.** Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*, v.59, p.1506-1514, 1998.
-