

Viabilidade do sêmen caprino lavado e não lavado diluído em água de coco, resfriado e armazenado a 4°C

Viability of washed and unwashed goat sperm diluted in coconut water, cooled and storage at 4°C

Ana Cláudia Nascimento Campos,* José Ferreira Nunes,** Alexandre Weick Uchôa Monteiro,***
Emmanuelle Lima de Figueirêdo,** Joaquim Hélder Teixeira Pinheiro,** Marcos Antonio Leal Ferreira,****
Airton Alencar de Araújo**

Resumo

A conservação do sêmen por períodos curtos é dependente da redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozoides a baixas temperaturas. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da época de coleta de sêmen sobre a viabilidade do sêmen lavado e não lavado, resfriado e armazenado a 4°C em diluidor água de coco. Foram utilizados 40 ejaculados provenientes de quatro caprinos da raça Saanen. Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto a concentração espermática e diluído a uma concentração final de 200×10^6 spz/ml. O sêmen diluído foi dividido em duas alíquotas iguais, e uma delas foi resfriada a 4°C (sêmen não lavado), a outra metade foi centrifugada para a remoção do plasma seminal, novamente diluída em água de coco e em seguida resfriada a 4°C (sêmen lavado). Assim, o sêmen foi avaliado a 0, 24, 48 e 72 horas de conservação a 4°C quanto a motilidade individual progressiva (MIP) e porcentagem de espermatozoides móveis (PEM) por meio do teste de termorresistência (TTR) a 37°C aos 5, 60 e 120 minutos de incubação. A taxa de degradação da motilidade (TDM) foi calculada ao final da incubação. Os parâmetros de MIP, PEM e TDM foram submetidos a ANOVA e Fisher's PLSD a 5%. A MIP no sêmen lavado foi superior ($p < 0,001$) até 48 horas de conservação a 4°C no período chuvoso e a 0h no período seco, não ocorrendo diferença na MIP nos outros tempos avaliados. Da mesma forma, no tocante a PEM, os resultados com o sêmen lavado foram também superiores ($p < 0,03$) até 48 horas no período chuvoso e até 24 e 72 horas no período seco. A época do ano influenciou a MIP ($p < 0,05$) somente a 0 e 24 horas para o sêmen lavado e 0h para o sêmen não lavado. A época do ano afetou a TDM do sêmen lavado somente no período seco e às 72 horas de conservação a 4°C ($11,20 \pm 3,08$). Uma degradação significativamente inferior ($p < 0,02$) foi constatada no sêmen lavado, somente na época seca às 72 horas de conservação. Concluiu-se que apesar da diferença encontrada entre os tratamentos, a qualidade do sêmen não lavado ainda permaneceu nos padrões aceitáveis para uso em programas de inseminação artificial, sendo recomendado, todavia, testes de fertilidade para comprovação da eficiência do sêmen submetido ao processo de conservação, e recomenda-se a lavagem do sêmen quando se deseja uma melhor qualidade espermática.

Palavras-chave: sêmen, caprino, lavagem, água de coco.

Abstract

The conservation of semen for short periods of time depends on the reversible reduction of motility and on the metabolic activity of the spermatozoa at low temperatures. We evaluated the effect of time of collection, cooling and storage at 4°C on the viability of washed and unwashed sperm diluted in coconut water. We used 40 ejaculates from four Saanen goats. After collection the semen was evaluated for sperm concentration and diluted to 200×10^6 spz/ml. The diluted sperm was divided into two equal aliquots, one of which was cooled at 4°C (unwashed sperm), while the other was centrifuged for removal of seminal plasma, diluted in coconut water again and cooled and stored at 4°C (washed sperm). The evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h of conservation. The samples were incubated at 37°C in a water bath to evaluate the progressive individual motility (PIM) and percentage of motile spermatozoa (PMS) by means of the heat resistance test (HRT) at 5, 60 and 120 min of incubation. The motility degradation rate (MDR) was calculated at the end of incubation. The parameters PIM, PMS and MDR were analyzed by ANOVA and Fisher's PLSD at 5%. The PIM for washed sperm was higher ($p < 0.001$) up to 48 h of storage at 4°C in the rainy season and at 0 h in the dry season, with better results being observed for washed semen. Concerning PEM, the effect of the presence of seminal plasma was observed up to 48 h in the rainy season and at 0, 24 and 72 h in the dry season ($P < 0.03$), with better results being observed for washed sperm. With respect to time of semen collection, a significant difference ($P < 0.05$) was

* Curso de Zootecnia - Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Av da Universidade, 850, Betânia, Sobral, CE. E-mail: nascimentocampos@yahoo.com

** Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará, UECE, Av Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE. ferreiranunes@hotmail.com, lukafig@yahoo.com, jhtp@zipmail.com.br, aaaraujo@zipmail.com.br

*** Médico-veterinário, Genética e Produção Caprinos, GP-caprinos - aweick@bol.com.br

**** Centro de Estudo Superior de Maceió - CESMAC, Maceió, AL - marcosvet@hotmail.com

observed only for PIM in both washed and unwashed sperm at 0 and 24 h of conservation. The season of the year affected the MDR of washed sperm only during the dry period and at 72 h of storage at 4°C (11.20 ± 3.08). A significantly lower degradation ($P < 0.02$) was observed in washed sperm only in the dry season at 72 h of storage. We conclude that, in spite of the difference found between treatments, the quality of unwashed semen was still acceptable for use in programs of artificial insemination. However, fertility tests are recommended to confirm the efficiency of the semen submitted to storage, and a sperm wash is recommended when a better sperm quality is desired.

Keywords: sperm, goat, washing, coconut water.

Introdução

Na região semi-árida do Nordeste do Brasil, os efeitos climatológicos são bem delimitados, determinando duas épocas: seca e chuvosa, interferindo na disponibilidade de alimentos, na temperatura e, conseqüentemente, influenciando a atividade sexual do macho caprino e ovino deslanado (Silva; Nunes, 1984). É bem conhecido que temperaturas elevadas exercem efeitos depressivos na qualidade do sêmen, podendo produzir alterações tais como: elevação do pH e da percentagem de espermatozoides anormais, diminuição da motilidade, da concentração espermática, do volume e da percentagem de espermatozoides móveis (Corteel, 1981). Nas condições semi-áridas, o fator temperatura parece ser o ponto fundamental das variações quanti-qualitativas do sêmen caprino. A distribuição das chuvas ameniza as temperaturas e contribui ainda para uma maior disponibilidade de pastagens que influenciam diretamente no aspecto nutricional dos animais (Nunes, 1988). A intensidade pluviométrica no Nordeste brasileiro está diretamente relacionada com a qualidade e disponibilidade das pastagens para os animais, assim as chuvas interferem indiretamente sobre o comportamento reprodutivo (NUNES, 1988).

A presença de fosfolipase A (Iritani e Nishikawa, 1964) e possivelmente, lisofosfolipase (Atreja e Anand, 1985) no sêmen caprino, catalisa a hidrólise de lecitinas em lisolecitinas e ácidos graxos livres (Snow, 1985). As lisolecitinas, devido à sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática, e os ácidos graxos são considerados tóxicos aos espermatozoides (Nunes, 1982). Em adição, a lecitina é o fosfolípido majoritário nas membranas plasmáticas dos espermatozoides e está também contida na gema de ovo, sendo, portanto, substratos perfeitos para a ação hidrolítica da fosfolipase (Roy, 1957).

Roy (1957) relatou a ação do plasma seminal sobre os elementos dos diluidores, no caso, a gema de ovo, mesmo estando a baixas concentrações como 2,5%.

Ritar e Salamon (1982) demonstraram que a gema de ovo a uma concentração de 9% no diluidor do sêmen caprino não lavado causou coagulação do meio com morte dos espermatozoides após 24 horas de incubação a 37°C. Os mesmos autores demonstraram que concentrações maiores que 1,5% deprimiram a sobrevivência espermática no sêmen não lavado após a descongelação. No entanto, Chauan e Anand (1990) revelaram que os lipídios da gema de ovo adicionados ao sêmen diluído não foram hidrolisados a lisofosfolípidos e ácidos graxos livres (Chauan e Anand, 1990). Dentro deste contexto, desenvolveram-se linhas de trabalho que preconizam a remoção do plasma seminal mediante centrifugação em solução tampão (Corteel, 1974), em associação ao uso da gema de ovo no diluidor (Trejo et al., 1987) ou em ausência de gema de ovo (Corteel, 1977).

A conservação do sêmen por períodos curtos é dependente da redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozoides a baixas temperaturas (Maxwell e Salamon, 1993; Machado e Simplicio, 1995). No entanto, a estocagem do sêmen refrigerado em diluidores à base de citrato – gema ou leite desnatado não deve exceder oito horas, pois a partir deste momento mais de 50% da motilidade é perdida (Sahni, 1987) e a capacidade fecundante do sêmen resfriado decresce enormemente. Todavia, poucos estudos têm sido realizados com o resfriamento do sêmen caprino em diluidor à base de água de coco contendo 2,5% de gema de ovo, bem como não se tem conhecimento se o período do ano (seco ou chuvoso) no semi-árido do Nordeste brasileiro, e a presença ou ausência do plasma seminal têm efeito sobre a viabilidade do sêmen de caprinos criados nesta região. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da época de coleta de sêmen sobre a viabilidade do sêmen lavado e não lavado, resfriado e armazenado a 4°C em diluidor à base de água de coco.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Faculdade de Veterinária do Ceará, Fortaleza, com latitude de 3°43' e longitude oeste de 38°30', com temperatura anual média de 27°C. O diluidor foi elaborado a partir da água de coco *in natura*, obedecendo ao seguinte protocolo: 50% de água de coco e 50% de citrato de sódio a 2,5%, contendo ainda 2,5% de gema de ovo, tendo sua osmolaridade ajustada para 300 milliosmoles e pH corrigido para 6,2 a 6,8. Neste experimento a solução de lavagem e a diluidora apresentam a mesma composição.

O sêmen foi coletado de quatro caprinos Saanen com idade média de dois anos por meio de uma vagina artificial. Permaneceram em manejo intensivo, recebendo 400g/dia de ração protéica. Após a coleta, o sêmen foi imediatamente avaliado quanto ao volume (mL) e concentração espermática (10^9 spz/mL). Logo após a primeira avaliação, o sêmen foi diluído em água de coco a uma concentração de 200×10^9 spz/mL, metade deste sêmen foi resfriado a 4°C (tratamento: sêmen não lavado) e a outra metade foi centrifugada (lavagem) para retirada do plasma seminal sendo também resfriada a 4°C (tratamento: sêmen lavado). A lavagem foi realizada duas vezes utilizando-se a mesma solução diluidora (centrifugado a 550g/15 min). Ambas amostras de sêmen foram avaliadas a 0, 24, 48 e 72 horas de resfriamento, onde pequenas amostras foram retiradas e submetidas ao TTR em banho-maria a 37°C; o sêmen foi avaliado quanto a motilidade progressiva individual (MIP) e porcentagem de espermatozoides móveis (PEM), por meio do TTR aos 5, 60, e 120 minutos de incubação.

A avaliação da MIP (vigor) é realizada subjetivamente e foi baseada numa escala de classificação segundo Baril et al. (1993): 0 (ausência de movimento espermático) a 5 (espermatozoides flexantes com um movimento retilíneo).

Estas observações foram realizadas em microscopia óptica (microscópio de contraste de fase) no aumento de 100X. Após cada incubação foram calculadas as médias de MIP e PEM [(5 min + 60 min + 120 min)/3] e a taxa de degradação da motilidade (TDM) pela seguinte fórmula:

$$\text{TDM} = \frac{(\text{MIP 5 min} - \text{MIP 120 min})}{\text{MIP 5 min}} \times 100$$

Para efeito de fiabilidade estatística, este experimento *in vitro* foi repetido dez vezes: cinco no período chuvoso (abril e maio) e cinco no período seco (setembro e outubro), perfazendo um total de 20 ejaculados no período chuvoso e 20 no período seco. Ressalta-se ainda que os ejaculados foram coletados apenas após o pleno estabelecimento dos períodos chuvoso e seco.

Os parâmetros de MIP, PEM e TDM foram expressos em média e erro-padrão (SEM) e submetidos a ANOVA ($p < 0,05$). Quando foi identificada diferença entre os tratamentos, os parâmetros foram submetidos ao teste Fisher's PLSD a $p < 0,05$ (Stat View, 5.0).

Resultados

Os resultados do experimento estão expressos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Média da Motilidade Individual Progressiva (MIP) e Percentagem de Espermatozoides Móveis (PEM) do sêmen caprino lavado e não lavado conservado por 72 horas a 4°C durante o período chuvoso e seco e avaliado pelo Teste de Termorresistência (TTR)

Tempo de resfriamento	Tratamento	TTR			
		MIP		PEM	
		Período do ano		Período do ano	
		chuvoso	seco	chuvoso	seco
0h	Não Lavado	3,67 ± 0,10 ^{aA*}	3,17 ± 0,13 ^{aA**}	68,61 ± 2,46 ^{aA}	61,52 ± 3,62 ^{aA}
	Lavado	4,07 ± 0,85 ^{b1*}	3,78 ± 0,07 ^{b1**}	79,90 ± 2,01 ^{b1}	75,91 ± 2,09 ^{b1}
24h	Não Lavado	3,32 ± 0,10 ^{aB}	3,21 ± 0,10 ^{AB}	53,14 ± 3,10 ^{aB}	51,11 ± 3,49 ^{aB}
	Lavado	3,77 ± 0,07 ^{b2*}	3,42 ± 0,09 ^{b2**}	65,88 ± 2,63 ^{b2}	60,26 ± 2,76 ^{b2}
48h	Não Lavado	3,05 ± 0,08 ^{aCBD}	2,73 ± 0,15 ^C	38,97 ± 3,28 ^{aCD}	40,00 ± 3,89 ^{CD}
	Lavado	3,62 ± 0,06 ^{b3,4}	3,02 ± 0,09 ^{3,4}	65,43 ± 1,79 ^{b3,4}	46,37 ± 2,69 ^{3,4}
72h	Não Lavado	2,81 ± 0,13 ^D	3,00 ± 0,07 ^{AD}	40,51 ± 3,31 ^D	34,79 ± 3,42 ^{aD}
	Lavado	2,73 ± 0,11 ⁴	2,84 ± 0,10 ⁴	44,44 ± 2,81 ⁴	46,66 ± 3,14 ^{b4}

^{ab} Letras diferentes, comparação entre sêmen não lavado e lavado $p < 0,001$

^{A, B, C e D} Letras diferentes, comparação entre o sêmen não lavado (0, 24, 48 e 72 h) $p < 0,001$

^{1, 2, 3 e 4} Números diferentes, comparação entre o sêmen lavado (0, 24, 48 e 72 h) $P < 0,001$

^{*, **} N° de asteriscos diferentes, comparação entre colunas: seco e chuvoso ($p < 0,01$).

Foi observada diferença na conservação entre o sêmen lavado e o não lavado nos parâmetros de MIP e PEM no período chuvoso quando conservados a 0, 24 e 48 horas ($p < 0,001$), com resultados superiores no sêmen lavado (Tabela 1). No período seco a MIP diferiu apenas no sêmen conservado a 0h ($p < 0,001$), onde o melhor resultado foi observado no sêmen lavado. No tocante a PEM, no período seco foram constatadas diferenças entre o sêmen lavado e não lavado conservado por 0, 24 e 72 h ($p < 0,001$), resultados superiores encontrados no sêmen lavado.

Também foi observado que o tempo de conservação diminuiu a viabilidade espermática do sêmen lavado e não lavado. No sêmen não lavado a MIP, no período chuvoso, foi superior a 0h quando comparada com os demais tempos de conservação ($p < 0,001$). No período seco não houve diferença entre o sêmen conservado por 0 e 24 horas ($p < 0,001$), todavia deferiram significativamente daquele conservado por 48 h ($p < 0,001$). No que se refere à PEM, também no sêmen não lavado, foi observado que tanto no período chuvoso como no seco não houve diferença entre o sêmen conservado por 0 e 24 horas; contudo, ambos foram superiores àqueles conservados por 48 e 72 horas ($p < 0,001$).

No sêmen lavado a MIP e a PEM tanto no período chuvoso como no seco foram significativamente superiores no sêmen conservado a 0 h ($p < 0,001$), não havendo diferença entre o sêmen conservado por 48 e 72 horas ($p > 0,001$).

A época do ano teve efeito somente sobre a MIP do sêmen lavado e não lavado conservado a 0 h e no sêmen lavado conservado a 24 horas, com resultados superiores observados no período chuvoso ($p < 0,001$).

Tabela 2: Taxa de Degradação da Motilidade (TDM) do sêmen caprino não lavado diluído em água de coco, resfriado a 4°C e conservado por até 72 horas

Período do ano	Tratamento	Tempo de Conservação			
		0 h	24 h	48 h	72 h
Seco	Não lavado	35,11 ± 4,47 ^a	20,91 ± 6,48	33,42 ± 9,84	16,66 ± 5,67
	Lavado	15,43 ± 7,47 ^b	21,45 ± 4,47	23,93 ± 5,06	11,20 ± 3,08 ^a
Chuvoso	Não lavado	31,10 ± 6,87	33,66 ± 9,22	16,04 ± 8,11	25,51 ± 10,71
	Lavado	27,37 ± 7,10	24,60 ± 7,19	25,50 ± 6,53	33,12 ± 7,60 ^p

^{a,b} Letras diferentes, comparação entre linhas ($p < 0,02$)

A época do ano afetou a TDM do sêmen lavado, onde uma menor degradação foi observada no período seco, com 72 horas / 4°C. No tocante ao tratamento dado ao sêmen antes do resfriamento (0h) uma degradação significativamente inferior ($p < 0,02$) foi constatada no sêmen lavado.

Discussão e conclusão

Os estudos têm demonstrado o efeito positivo da lavagem sobre a motilidade do sêmen caprino, mostrando que a remoção do plasma seminal foi benéfica na preservação da integridade dos espermatozoides após a congelação (Memon et al., 1985). Pois as secreções das glândulas bulbo-uretrais promovem diminuição na PEM, deterioração na qualidade do movimento, quebra do acrossoma e morte celular dos espermatozoides caprinos diluídos no leite desnatado (Pellicer-Rubio et al. 1997). No presente estudo, o efeito da presença do plasma seminal sobre a MIP foi observada principalmente no período chuvoso e 0h do período seco até 48 horas, apresentando resultados superiores no sêmen lavado (Tabela 1). No tocante à PEM, o efeito da presença do plasma seminal foi observado até 48 horas do período chuvoso e a 0, 24 e 72 horas no período seco ($p < 0,001$), onde resultados superiores foram constatados no sêmen lavado (Tabela 1). Pellicer-Rubio e Combarous (1998) sugerem que a deterioração do espermatozoide na presença das secreções das bulbo-uretrais em caprinos é devido à catálise de triglicerídeos hidrolisáveis e que as proteínas aumentam esta atividade catalítica.

Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho, onde não se constatou diferença entre o sêmen lavado e o não lavado após 48 horas de resfriamento (Tabela 1) no período chuvoso e no seco (exceto sobre a PEM – 72 horas), demonstrando que após este período a presença ou ausência de plasma seminal não interferiu na qualidade espermática, ou já interferiu ao máximo. Porém antes de 48 horas os resultados sugerem que o plasma seminal foi um fator negativo na conservação do sêmen, sugerindo que alguns componentes presentes no plasma seminal poderão ter interagido com os constituintes do diluidor, possivelmente a gema de ovo, exercendo ação tóxica sobre os espermatozoides e interferindo, assim, na sobrevivência espermática. Já foi demonstrado que a adição de gema de ovo ao diluidor teve efeito benéfico sobre a PEM no sêmen ovino (Fiser e Fairfull, 1986). Entretanto, em caprinos, concentrações maiores que 1,5% de gema de ovo no diluidor têm efeito deletério no sêmen caprino não lavado (Ritar e Salamon, 1982). Alguns estudos indicam que a fração lipoprotéica de baixa densidade da gema de ovo é a fonte de proteção do espermatozoide ovino contra os efeitos do

armazenamento a 5°C (Watson e Martin, 1975). Watson (1981) observou que a da fração lipoprotéica da gema de ovo serviu para solubilizar o lipídio e ligá-lo à membrana da célula. Mais recentemente, Moussa et al. (2002) demonstraram a efetiva propriedade crioprotetora à fração lipoprotéica sobre os espermatozoides, pois melhor motilidade espermática foi obtida com a adição da gema de ovo. No presente

estudo foi evidente a eficiência da gema de ovo na conservação do sêmen caprino, pois tanto o sêmen lavado quanto o não lavado permaneceram com bons índices de qualidade espermática. Estudos conduzidos por Braz (2003) demonstraram a ineficiência da água de coco para a conservação do sêmen resfriado quando não há adição de gema de ovo.

Ahmad et al. (1996) demonstraram que a remoção do plasma seminal do sêmen de búfalo favoreceu a viabilidade do mesmo quando diluído no leite desnatado-gema de ovolípidos após incubação a 37°C. Bedford et al. (1995) constataram que no sêmen equino há interação deletéria entre o plasma seminal e a gema de ovo, diminuindo assim a motilidade após longo período de armazenamento (Bedford et al., 1995). Também comprovaram que a centrifugação do sêmen é essencial se a gema de ovo é adicionada ao diluidor. Resultado semelhante foi observado no presente estudo, pois uma maior PEM e MIP foi obtida no sêmen lavado. Brinsko et al. (2000) afirmaram que a centrifugação e remoção parcial do plasma seminal antes do resfriamento e armazenamento foi benéfico para os espermatozoides equinos que sofreram uma excessiva redução na motilidade espermática progressiva, especialmente quando o sêmen é resfriado e armazenado por mais de 24 horas.

A diluição do sêmen, presumivelmente, também remove proteínas adsorvidas, anti-oxidantes naturais e outros componentes benéficos do plasma seminal (Maxwell e Johnson, 1999). Assim, altas taxas de diluição têm efeito deletério sobre os espermatozoides de touros, parecem ser mais deletérias para a função mitocondrial (Garner et al., 2001). O efeito compensatório do plasma seminal foi evidenciado após armazenamento a 5°C/24 horas, onde o plasma seminal beneficiou a função espermática *in vitro* (Garner et al., 2001). Este resultado diferiu do encontrado no presente trabalho, pois a presença do plasma seminal diminuiu a viabilidade espermática *in vitro* até 48 horas / +4°C (tabela 1). Também diferiram dos resultados obtidos por Roca et al. (1997), que não observaram diferenças na qualidade espermática (MIP e PEM) entre o sêmen lavado e não lavado nas condições climáticas da Espanha. Os resultados do presente trabalho também diferiram daquele observado por Pérez-Pe et al. (2001), demonstrando que após o resfriamento a +5°C a 0h, a ausência de proteínas do plasma seminal provocou uma diminuição no número de células viáveis no sêmen ovino.

No tocante à época de coleta do sêmen (seca ou chuvosa), foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$), somente quanto à MIP tanto no sêmen lavado e não lavado a 0 e 24 horas de conservação (Tabela 1).

A época do ano afetou a TDM do sêmen lavado, onde uma menor degradação foi observada no período seco, com 72 horas/4°C (Tabela 2).

No tocante ao tratamento dado ao sêmen antes do resfriamento (lavagem ou não), uma degradação significativamente inferior ($P < 0,02$) foi constatada no sêmen lavado (Tabela 2). Estes resultados também contribuem para demonstrar o efeito deletério do plasma seminal sobre a MIP.

Referências

AHMAD, M.; KHAN, A.; SHAH, Z. A.; AHMAD, K. M. Effects of removal seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v. 41, p. 193-199, 1996.

ATREJA, S. K.; ANAND, S. R. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis. *J. Reprod. Fert.*, Colchester, v. 74, p. 687-691, 1985.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.-C. Manuel de formation pour l'insemination artificielle chez les ovins et les caprins. INRA. Nouzilly, 231 p. 1993.

BEDFORD, S. J.; GRAHAN, J. K.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma. *Theriogenology*, New York, v. 43, p. 939-953, 1995.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, New York, v. 54, p. 129-136, 2000.

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

CORTEEL, J. M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal. Effect du glucose. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* Paris, v. 14, p. 741-745, 1974.

CORTEEL, J.-M. Production, storage and insemination of goat semen. SYMPOSIUM OF MANAGEMENT OF REPRODUCTION IN SHEEP AND GOATS, 1977, Madison - University of Wisconsin. *Proceedings...* 1977, p. 41-57.

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

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, York, v. 23, n. 6, p. 518-524, 1986.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. G.; GRAVANCE, C. G.; MARSHALL, C. E.; DEJARNETTE, J. M.; ALLEN, C. H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect bovine sperm. *Theriogenology*, New York, v. 56, p. 31-40, 2000.

IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg coagulating enzyme in goat semen. *Japan. J. Zooth. Sci.*, v. 10, p. 57-62, 1964.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação Artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. *Rev. Bras. Repr. Animal*. Belo Horizonte, v. 19, p. 61-72, 1995.

MAXWELL, W. M. C.; SALAMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.*, Collingwood, v. 5, p. 613-638, 1993.

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

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

Concluiu-se que apesar da diferença encontrada entre os tratamentos, a qualidade do sêmen não lavado ainda permaneceu nos padrões aceitáveis para uso em programas de inseminação artificial, sendo recomendado, todavia, testes de fertilidade para comprovação da eficiência do sêmen submetido ao processo de conservação, e recomenda-se a lavagem do sêmen quando se deseja uma melhor qualidade espermática.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TAINURIER, D. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective affect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, New York, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

NUNES, J. F. *Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc*. 1982. 45 f. Thèse (Doctorat), 3^e cycle, Paris VI. 1982.

NUNES, J. F. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Repr. Ani.*, Belo Horizonte, v. 12, p. 77-83, 1988.

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

PELLICER-RUBIO, M. T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.*, Colchester, v. 112, n. 1, p. 95-105, 1998.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIAN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Seminal plasma proteins prevents cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, New York, v. 56, p. 425-434, 2001.

RIGBY, S. L.; BRINSKO, S. P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v. 68, p. 171-180, 2001.

RITAR, A. J.; 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, n. 3, p. 305-312, 1982.

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

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

SAHNI, K. L. Practical aspect of artificial insemination of goats in India. INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT, 4., 1987, Brasília, DF. *Proceedings...* 1987. EMBRAPA - DTC. p. 549-569.

SILVA, A. E. D. F.; NUNES, J. F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslanados das raças Santa Inês e Somalis. *Rev. Bras. Repr. Ani.*, Belo Horizonte, v. 8, p. 207-214, 1984.

SNOW, J. T. Lecithins and Lysolecithins. In: Hoescht Doc. No. 8134 - 285. New York. 9p. 1985.

TREJO, A.; PERALTA, M.; CASTRO, P.; HERRERA, D. Frozen caprine semen in TRIS egg yolk based extenders. INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987, Brasília, DF. *Proceedings...* 1987. EMBRAPA - DTC, p. 1499.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.*, Colchester, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

WATSON, P. F.; MARTIN, I. C. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 28, n. 2, p. 145-152, 1975.