

Efeito de dois tipos de diluidores e dois métodos de congelação na qualidade do sêmen criopreservado de caprinos

Effect of two kinds of diluents and two freezing methods on caprine semen quality

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Valquíria Hyppolito Barnabe
Departamento de Reprodução
Animal
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP
Cidade Universitária Armando de
Salles Oliveira
Av. Orlando Marques de Paiva, 87,
05508-000 - São Paulo - SP
e-mail: vhbarnab@usp.br

1-Departamento de Reprodução
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da USP-SP

Silvia FERRARI; Valquíria Hyppolito BARNABE¹

RESUMO

Foram colhidos 85 ejaculados de 4 reprodutores caprinos das raças Alpina, Saanen, Toggenburg e Anglonubiana, que foram divididos em 193 amostras de sêmen com o objetivo de proceder à congelação nos diluidores à base de TRIS e à base de leite desnatado, usando 2 métodos de congelação: com presença e ausência do plasma seminal. Analisaram-se as características físicas e morfológicas do sêmen logo após a colheita. Foi observada variação individual no volume, motilidade retilínea e progressiva e patologia espermática dos ejaculados dos animais estudados. Após a congelação, foi feita avaliação da motilidade retilínea e progressiva, do teste de termorresistência e da porcentagem de acrossomos intactos dos espermatozoides. O diluidor à base de TRIS com 2,6% de gema de ovo mostrou-se mais eficiente na congelação do sêmen de caprinos em relação ao diluidor à base de leite desnatado. A retirada do plasma seminal não alterou os resultados de congelação do sêmen de caprinos. Após 3 meses de estocagem em nitrogênio líquido, realizou-se uma nova análise da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozoides, quando os ejaculados submetidos à retirada do plasma seminal e congelados em diluidor à base de TRIS apresentaram perda da motilidade retilínea e progressiva.

UNITERMOS: Sêmen congelado; Caprinos; Diluentes.

INTRODUÇÃO

A espécie caprina, por ser poliéstrica estacional, apresenta o auge da estação reprodutiva nos meses de outono nas regiões sudeste e sul do Brasil, concentrando as parições na primavera. Este fato determina uma entressafra da produção de leite no outono e inverno, justamente na época de maior consumo de queijos. Esta situação pode ser contornada nas fêmeas através de tratamentos hormonais indutores de estro na primavera e, nos machos, através da congelação dos ejaculados obtidos durante a estação sexual⁸.

No Brasil, a reprodução dos caprinos é feita, em sua maior parte, através da monta natural, com reprodutores de raças de origem européia selecionados por suas características fenotípicas. Com frequência, estes animais são responsáveis pela formação de rebanhos leiteiros pela utilização de cruzamento absorvente com animais nativos. Diante de tal fato,

o uso de sêmen congelado promoveria um rápido e eficiente melhoramento genético do rebanho caprino nacional.

Em relação às características seminais da espécie caprina, alguns autores^{13,18} observaram variações individuais entre os reprodutores. A fim de promover a conservação do sêmen, são utilizados a gema de ovo e o leite desnatado tratado pelo calor, que apresentam duas vantagens definidas. Em primeiro lugar, protegem os espermatozoides, tornando-os mais resistentes ao choque de temperatura devido às lipoproteínas da gema e à caseína do leite desnatado. Em segundo lugar, contém fatores de conservação, como proteínas, sais minerais e açúcares⁶. Roy¹⁴ observou que o efeito nocivo do plasma seminal do caprino vem de uma enzima tipo fosfolipase secretada pela glândula bulbouretral, que interage com os fosfolípidos da gema de ovo, constituindo o diluidor, resultando em lisolecitinas e ácidos graxos que são tóxicos ao espermatozoide. O espermatozoide de caprinos é muito suscetível ao choque térmico e, portanto, adequados níveis de

gema de ovo são necessários para o sucesso da estocagem do sêmen¹⁵. Porém, Ritar; Salamon¹² afirmam que a concentração de 1,5% de gema de ovo no diluidor à base de TRIS é suficiente para a criopreservação do sêmen de caprinos sem a remoção do plasma seminal. Com a finalidade de eliminar a lavagem do sêmen, Resende; Weitze¹¹ desenvolveram o diluente TRIS modificado. A motilidade retilínea e progressiva e a porcentagem de acrossomos normais dos espermatozoides de caprinos após a congelamento foi de 63,6 e 57,5 respectivamente. Outros autores^{9,10} concluíram que a retirada do plasma seminal não trouxe benefícios à congelamento do sêmen de caprinos em meio à base de TRIS, ao contrário do que preconiza Corteel⁴, que trabalhou com diluidor à base de leite desnatado. Este autor² estudou a viabilidade dos espermatozoides da espécie caprina conservados em diluidor à base de leite desnatado e congelados com ou sem o plasma seminal. Após 48 horas de permanência em nitrogênio líquido, as palhetas foram descongeladas e incubadas durante 120 minutos a 37°C. Após este período de teste de termorresistência, a porcentagem de espermatozoides móveis das amostras de sêmen sem o plasma seminal foi significativamente superior à porcentagem daquelas contendo o plasma seminal. O mesmo autor³ estimou a porcentagem de espermatozoides móveis após a descongelamento, e verificou que há uma diminuição de acordo com o tempo de conservação no nitrogênio líquido. Esta diminuição na porcentagem de espermatozoides móveis foi de 16,3% e 22% para os períodos de estocagem de 3 a 90 dias e 91 a 180 dias, respectivamente. Com a retirada do plasma seminal, esta diminuição é anulada para o tempo de conservação de 3 a 90 dias e é reduzida a 1,3% para o período de 91 a 180 dias. Pintado; Perez⁷ analisaram as amostras seminais congeladas em diluidores à base de TRIS e de leite desnatado depois de 24 horas, 1, 3, 6, 9 e 12 meses após a congelamento. Foram analisadas as porcentagens de espermatozoides móveis e de acrossomos intactos. Os resultados não mostraram diferenças significativas dos quatro tratamentos em relação à perda da motilidade ao longo do tempo de preservação em nitrogênio líquido.

Este trabalho visa comparar dois diluidores (à base de TRIS e à base de leite desnatado) e dois métodos de congelamento (com presença e ausência de plasma seminal), a fim de padronizar a técnica e fornecer subsídios àqueles interessados em montar um programa de inseminação artificial na espécie em questão.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São

Paulo, sediado no Campus de Pirassununga, nos meses de fevereiro a junho de 1992. Foram selecionados quatro reprodutores caprinos puros de origem e adultos, das raças Saanen, Alpina, Toggemburg e Anglonubiana, com base em espermogramas. Foram efetuadas 85 coletas de sêmen por meio de vagina artificial, utilizando-se uma fêmea em cio como manequim. Após a colheita, foi determinado o volume do ejaculado, a avaliação do turbilhonamento, da motilidade retilínea e progressiva e foi coletada uma gota de cada ejaculado para a posterior análise da patologia espermática através da técnica de câmara úmida. Procedeu-se também à contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer. Cada amostra de sêmen foi dividida em 4 alíquotas de aproximadamente 0,5 ml cada, duas delas sendo submetidas a lavagem a fim de retirar o plasma seminal para posterior diluição nos dois meios em teste. As duas alíquotas restantes foram diluídas nos diluidores sem a retirada do plasma seminal. A dupla lavagem do ejaculado foi feita com solução de Krebs-Ringer-Fosfato² em proporção de 1 ml de sêmen para 9 ml de solução de lavagem, em centrífuga a 600 g por 15 minutos. Foram usados meios à base de leite desnatado descrito por Corteel² e à base de TRIS descrito por Evans; Maxwell⁵ a 37°C e à temperatura ambiente com o intuito de diluir respectivamente as amostras de sêmen que continham o plasma seminal e aquelas que não continham, para obter uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides por palheta. As amostras diluídas foram levadas a um balcão refrigerado onde permaneceram por aproximadamente 2 horas até atingir a temperatura de 4°C, quando as amostras em meio à base de leite desnatado sofreram glicerolização. As palhetas foram preenchidas e lacradas com álcool polivinílico e colocadas sobre uma grade a 4 cm do nitrogênio líquido contido em uma caixa de isopor, a fim de sofrer resfriamento pelo vapor de nitrogênio por 15 minutos. A seguir, houve a congelamento a -196°C, através do contato direto das palhetas com o nitrogênio líquido. Em seguida à congelamento, uma palheta de cada amostra foi descongelada para a avaliação da motilidade retilínea e progressiva. Após 3 meses, outra palheta de cada amostra foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos para uma nova avaliação da motilidade retilínea e progressiva. Para a avaliação da morfologia do acrossomo, foram descongeladas no total 88 palhetas, com as quais foi efetuada a técnica de câmara úmida, que consiste em adicionar 3 gotas do sêmen congelado em 1 ml de solução de formol-salino a 37°C, seguida de pipetagem de uma gota da solução de sêmen e formol-salino em lâmina com cobertura de lamínula e vedação com esmalte sintético. A lâmina foi avaliada em microscópio de interferência diferencial de fase com aumento de 1.250 vezes. Pelo teste de termorresistência¹, avaliou-se a porcentagem de espermatozoides com motilidade retilínea e

progressiva após 3 horas em banho-maria a 37°C, do sêmen de 60 palhetas de diferentes amostras que apresentaram motilidade retilínea e progressiva pós-congelação acima de 30%. Os resultados de motilidade retilínea e progressiva após a congelação nos diluidores e métodos em uso foram analisados através do teste de qui-quadrado. Os resultados de características físicas e morfológicas do sêmen e de patologia do acrossomo pós-congelação obtidos em porcentagens foram transformados em arcosseno de acordo com Snedcor; Cochram¹⁶, e a análise estatística foi efetuada utilizando-se os métodos preconizados pelo "Statistical Analysis System"¹⁷. Empregou-se a análise de variância e o teste de Duncam para o contraste entre as médias.

RESULTADOS

A Tab. 1 apresenta a média e o erro da média do volume, concentração, motilidade retilínea e progressiva, turbilhonamento e patologia espermática total do sêmen de 4 reprodutores caprinos. Houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a média do volume dos ejaculados dos animais das raças Alpina e Anglonubiana e dos animais

das raças Saanen e Toggemburg, porém a média do volume dos ejaculados dos animais das raças Saanen e Anglonubiana não diferiram estatisticamente entre si. A média da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozóides do animal da raça Saanen diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos animais das raças Anglonubiana e Toggemburg. O animal da raça Anglonubiana apresentou a menor porcentagem de patologias espermáticas nos ejaculados, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) da porcentagem encontrada nos ejaculados dos outros 3 animais.

A Tab. 2 descreve a distribuição da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozóides após a congelação em dois tipos de diluidores e dois métodos de congelação de sêmen. Houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras seminais sem o plasma seminal e congeladas em diluidores à base de leite desnatado e à base de TRIS.

A distribuição da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozóides de caprinos após 3 meses de congelação em dois tipos de diluidores, usando dois métodos de congelação, está representada na Tab. 3. A motilidade retilínea e progressiva dos espermatozóides congelados com o plasma seminal e em diluidor à base de TRIS diferiu estatisticamente daquela dos espermatozóides congelados com o plasma

Tabela 1

Média e erro da média do volume, concentração, motilidade, turbilhonamento e patologia espermática total do sêmen de 4 reprodutores caprinos. Pirassununga - SP, 1992.

Raça	Frequência (n)	Volume (ml)	Concentração	Motilidade	Turbilhonamento	Patologia
		Média ± SE	(10 ⁹ esperm./ml)	(%)		espermática %
		Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE
Alpina	21	1,5±0,1 ^a	4,0±0,3	75,2±1,6 ^{a,b}	4,2±0,1	14,1±2,7 ^a
Saanen	25	1,0±0,1 ^{b,c}	4,2±0,3	77,0±0,9 ^a	4,5±0,1	12,8±1,3 ^a
Anglonubiana	23	1,3±0,1 ^{a,c}	4,8±0,2	72,6±1,6 ^b	4,1±0,1	8,9±1,6 ^b
Toggemburg	16	0,9±0,1 ^b	4,1±0,4	72,5±1,1 ^b	4,2±0,2	12,8±1,7 ^a

SE = Erro da média; ^{a,b,c}: números seguidos de letras desiguais na mesma coluna diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$).

Tabela 2

Distribuição da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozóides de caprinos após a congelação em dois tipos de diluidores usando dois métodos de congelação. Pirassununga - SP, 1992.

Diluidor	Método	Frequência (n)	Motilidade		
			0↔30%	30↔60%	60↔100%
			n (%)	n (%)	n (%)
1	A	50	21 (42,0) ^a	28 (56,0) ^a	1 (2,0) ^a
1	B	47	26 (55,3)	19 (40,4)	2 (4,3)
2	A	47	34 (72,3) ^b	13 (27,7) ^b	0 (0) ^b
2	B	49	36 (73,5)	12 (24,5)	1 (2,0)
Total		193	117 (60,6)	72 (37,3)	4 (2,1)

1 = diluidor à base de TRIS 2 = diluidor à base de leite desnatado A = retirada do plasma seminal B = sem retirada do plasma seminal a,b: números seguidos de letras desiguais na mesma coluna diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$).

Tabela 3

Distribuição da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozoides de caprinos após três meses da congelação em dois tipos de diluidores usando dois métodos de congelação. Pirassununga - SP, 1992.

Diluidor	Método	Frequência (n)	Motilidade		
			0↔30% n (%)	30↔60% n (%)	60↔100% n (%)
1	A	50	31 (62,0)	16 (32,0)	3 (6,0)
1	B	47	22 (46,8) ^a	23 (48,9) ^a	2 (4,3) ^a
2	A	47	33 (70,2)	13 (27,7)	1 (2,1)
2	B	49	34 (69,4) ^b	11 (22,5) ^b	4 (8,1) ^b
Total		193	120 (62,2)	63 (32,6)	10 (5,2)

1 = diluidor à base de TRIS 2 = diluidor à base de leite desnatado A = retirada do plasma seminal B = sem retirada do plasma seminal a,b: números seguidos de letras desiguais na mesma coluna diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$).

Tabela 4

Distribuição da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozoides de caprinos após o teste de termorresistência-TTR, congelados em dois tipos de diluidores usando dois métodos de congelação. Pirassununga - SP, 1992.

Diluidor	Método	Frequência (n)	Motilidade				
			0%	0↔10%	10↔20%	20↔30%	30%–
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	A	22	4 (18,2)	3 (13,6)	3 (13,6)	5 (22,7)	7 (31,9)
1	B	19	6 (31,6)	1 (5,2)	6 (31,6)	0 (0)	6 (31,6)
2	A	10	9 (90,0)	1 (10,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	B	10	5 (50,0)	0 (0)	3 (30,0)	0 (0)	2 (20,0)

1 = diluidor à base de TRIS;
2 = diluidor à base de leite desnatado;
A = retirada do plasma seminal;
B = sem retirada do plasma seminal.

Tabela 5

Média e Erro da Média da porcentagem de patologias do acrossomo de espermatozoides após a congelação em dois tipos de diluidores usando dois métodos de congelação. Pirassununga - SP, 1992.

Diluidor	Método	Frequência (n)	Patologia do Acrossomo (%)
			Média ± S.E.
1	A	21	13,7 ± 2,1
1	B	22	14,7 ± 1,8
2	A	22	17,5 ± 2,0
2	B	23	18,0 ± 3,0

S.E. = Erro da Média 1 = diluidor à base de TRIS 2 = diluidor à base de leite desnatado;
A = retirada do plasma seminal B = sem retirada do plasma seminal.

seminal porém em diluidor à base de leite desnatado ($p \leq 0,05$). Comparando-se os resultados de motilidade retilínea e progressiva, após a congelação nos dois diluidores e métodos em uso, com os resultados obtidos após três meses de congelação (Tab. 2 e 3) pelo método do qui-quadrado, encontramos diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a motilidade retilínea e progressiva das amostras

congeladas em diluidor à base de TRIS sem o plasma seminal.

A distribuição da motilidade retilínea e progressiva dos espermatozoides após o teste de termorresistência-TTR em sêmen congelado de quatro reprodutores caprinos está representada na Tab. 4. As médias e o erro da média das porcentagens de patologias do acrossomo observadas nas amostras seminais congeladas em diluidor à base de TRIS

com e sem a retirada do plasma seminal e em diluidor à base de leite desnatado com e sem a retirada do plasma seminal é respectivamente igual a $13,7 \pm 2,1\%$, $14,7 \pm 1,8\%$, $17,5 \pm 2,0\%$, $18,0 \pm 3,0\%$, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) em relação às patologias do acrossomo (Tab. 5).

DISCUSSÃO

O volume do ejaculado dos 4 reprodutores utilizados no experimento variou em média de $0,9 \pm 0,1$ a $1,5 \pm 0,1$ ml, valores estes que estão de acordo com Evans; Maxwell⁵, que relatam uma variação de 0,5 a 1,5 ml de volume do ejaculado da espécie caprina. A concentração espermática dos ejaculados dos 4 animais variou em média de $4,0 \pm 0,3 \times 10^9$ a $4,8 \pm 0,2 \times 10^9$ espermatozoides/ml de sêmen, em concordância com Evans; Maxwell⁵, assim como a motilidade retilínea e progressiva, que variou em média de $72,5 \pm 1,1\%$ a $77,0 \pm 0,9\%$, o turbilhonamento, de $4,1 \pm 0,1$ a $4,5 \pm 0,1$, e as médias de patologias espermáticas totais, de $8,9 \pm 1,6\%$ a $14,1 \pm 2,7\%$. Diante dos resultados descritos, podemos afirmar que os animais utilizados neste experimento possuem características seminais dentro dos padrões da espécie caprina, porém pudemos observar diferenças estatisticamente significativas entre o volume, motilidade retilínea e progressiva e patologias espermáticas entre os ejaculados dos 4 animais estudados. Esta variação individual das características seminais também foi encontrada por Tuli; Holtz¹⁸ e Roca *et al.*¹³. As características seminais dos animais apresentaram-se acima do limite imposto para se processar a congelação, no qual os valores mínimos de motilidade retilínea e progressiva, turbilhonamento foram fixados em 70% e 3, respectivamente, e os valores máximos de patologias espermáticas totais foram fixados em 15%. Foi utilizado no presente experimento o diluidor à base de TRIS, que leva em sua composição 2,6% de gema de ovo. Esta quantidade vai ao encontro da baixa porcentagem utilizada por Ritar; Salamon¹², que afirmam que a concentração de 1,5% de gema de ovo no diluidor à base de TRIS está na margem de segurança para a criopreservação do sêmen caprino. Houve maior número de amostras seminais apresentando a motilidade retilínea e progressiva dos espermatozoides acima de 30% quando congeladas no diluidor à base de TRIS em relação ao diluidor à base de leite desnatado, o que demonstra uma boa proteção da gema de ovo, mesmo em pequena quantidade. No que se refere à patologia do acrossomo dos espermatozoides após a congelação, não houve variação estatisticamente significativa desta característica em função do tipo de diluidor utilizado na criopreservação seminal. Os resultados referentes à motilidade retilínea e progressiva das amostras seminais contendo ou não

o plasma seminal e diluídas em TRIS-gema de ovo e em leite desnatado mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre a congelação do sêmen com ou sem plasma seminal em ambos os diluidores. Estes resultados são discordantes dos obtidos por Corteel², que observou efeito benéfico da retirada do plasma seminal sobre a motilidade dos espermatozoides após a congelação, e concordam com Pintado *et al.*⁹, que não observaram diferenças entre os dois métodos. As amostras de sêmen congeladas em diluidor à base de TRIS apresentaram melhor resultado de motilidade retilínea e progressiva após o teste de termorresistência, independente ou não da presença do plasma seminal, em relação às amostras congeladas em meio à base de leite desnatado. Ao contrário, Corteel² encontrou melhores resultados de TTR quando da retirada do plasma seminal, em sêmen congelado em diluidor à base de leite desnatado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras contendo ou não o plasma seminal em ambos os diluidores em relação à patologia do acrossomo dos espermatozoides após o congelamento, ao contrário do que foi encontrado por Corteel⁴, que detectou 50% de alterações de membranas em ejaculados congelados com o plasma seminal. Após a estocagem de 3 meses em nitrogênio líquido, houve perda na motilidade retilínea e progressiva das amostras seminais congeladas em diluidor à base de TRIS quando da retirada do plasma seminal. As amostras seminais congeladas em diluidor à base de TRIS contendo o plasma seminal e em leite desnatado com e sem o plasma seminal não apresentaram perda da motilidade retilínea e progressiva, concordando com Pintado; Perez⁷, que não encontraram perda da motilidade retilínea e progressiva após a estocagem em nitrogênio líquido, porém discordando de Corteel³, que observou a diminuição da motilidade dos espermatozoides após 90 dias de estocagem devido à presença do plasma seminal, quando congelados em diluidor à base de leite desnatado.

CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste experimento e dentro das finalidades a que foi proposto, pode-se concluir que:

1. o uso do diluidor à base de TRIS (hidroximetil amino metano) com 2,6% de gema de ovo mostrou-se mais eficiente que o diluidor à base de leite desnatado na criopreservação dos espermatozoides de caprinos;
2. a retirada do plasma seminal não alterou os resultados de motilidade retilínea e progressiva após a congelação, teste de termorresistência e patologias do acrossomo dos espermatozoides, quando comparada aos resultados de congelação dos ejaculados contendo o plasma seminal.

SUMMARY

From February to June 1992, were made 85 semen collections from adult male goats, belonging to the following breeds: Alpine, Saanen, Toggenburg and Anglonubian. Seminal material was divided into 193 samples frozen in TRIS and fat-free milk diluents, through two freezing methods, that is, with and without seminal plasma. Physical and morphologic characteristics were evaluated soon after collections, having been found individual variations in volume, progressive motility, and sperm pathology. In thawed samples, new evaluations of progressive motility were made, as well as thermoresistance tests (TRT) and ratio of intact acrosomal caps. Samples diluted in TRIS with 2.6% of egg-yolk were more efficient in freezing process than those in fat-free milk diluent. Withdraw of seminal plasma did not affect the results of freezing. Relatively to acrosomal caps there were no noted differences. Three months later, samples diluted in TRIS without seminal plasma had lost progressive motility.

UNITERMS: Frozen semen; Goats; Diluents.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- 1- COLAS, G.; GUERIN, Y. Fertility of ram semen after thawing and storage at 15°C for a few hours. *In: CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION*, 10., University of Illinois, 1984. **Abstracts**, p.188.
- 2- CORTEEL, J.M. Viabilité de spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Annales de Biologie Animal, Biochimie et Biophysie*, v.14, n.4-B, p.741-5, 1974.
- 3- CORTEEL, J.M. Effet du "lavage" sur la conservation des spermatozoïdes de bouc a basse température. *Annales de Biologie Animal, Biochimie et Biophysie*, v.15, n.3, p.525-8, 1975.
- 4- CORTEEL, J.M. Effets du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reproduction, Nutrition, Développement*, v.20, n.4A, p.1111-23, 1980.
- 5- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. North Ryde, Butterworths Pty, 1987.
- 6- MIES FILHO, A. *Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial*. 6.ed. Porto Alegre, Editora Sulina, 1987. v.2, p.475.
- 7- PINTADO, B.; PEREZ, B. Effect of conservation length on buck ejaculates frozen with egg-yolk. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS*, 5.; New Delhi, 1992. **Abstracts**. New Delhi, 1992. p.286.
- 8- PINTADO, B.; PEREZ, B.; GIL, L. Efecto del método de congelación sobre la calidad in vitro del semen de macho cabrío Verato. *Avances en Alimentación y Mejora Animal*, v.31, n.6, p.269-72, 1991.
- 9- PINTADO, B.; PEREZ, B.; MATEOS, E. Effect of season on freezability of Verata buck spermatozoa. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS*, 5.; New Delhi, 1992. **Abstracts**. New Delhi, 1992. p.290.
- 10- PUROHIT, J.R.; BHOREKAR, M.R.; MANGURKAR, B.R. Studies on deep freezing of buck semen. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS*, 5., New Delhi, 1992. **Abstracts**. New Delhi, 1992. p.290.
- 11- RESENDE, J.; WEITZE, K.F. Congelamento de sêmen de caprino com diluente tris modificado. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 24.; SIMPÓSIO SOBRE REPRODUÇÃO ANIMAL, 4., Brasília, 1987. **Summary**. Brasília, 1987.
- 12- RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biological Science*, v.35, p.305-12, 1982.
- 13- ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VAZQUES, J.M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science*, v.29, n.3-4, p.255-62, 1992.
- 14- ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and cowper's gland of the goat. *Nature*, v.179, p.318-9, 1957.
- 15- SAHANI, K.L.; ROY, A. A note on seasonal variation in the occurrence of abnormal spermatozoa in different breeds of sheep and goat under tropical conditions. *Indian Journal of Animal Science*, v.42, n.7, p.501-4, 1972.
- 16- SNEDCOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6.ed. Ames, The Iowa State University Press, 1967.
- 17- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. *SAS user's guide: statistics*. 1985, Cary, 1985. 956p.
- 18- TULI, R.K.; HOLTS, W. The effect of season on seminal characters in Boer goat bucks in the northern temperate zone. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS*, 5., New Delhi, 1992. **Proceedings**. New Delhi, 1992. p.1195-200.

Recebido para publicação: 14/05/1998
Aprovado para publicação: 26/02/1999