

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**A CONCENTRAÇÃO, A COMPOSIÇÃO E A QUALIDADE DO PLASMA  
SEMINAL NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO A +4°C**

**FREDERICO LANÇA SCHMITT**

**Porto Alegre, Setembro de 2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**A CONCENTRAÇÃO, A COMPOSIÇÃO E A QUALIDADE DO PLASMA  
SEMINAL NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO A +4°C**

**FREDERICO LANÇA SCHMITT**

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
ao grau de mestre em Medicina Veterinária, área  
de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

**Porto Alegre, Setembro de 2002**

APROVADO POR:

Membro da Banca

Membro da Banca

Membro da Banca

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos, pelo compreensão, auxílio e amizade.

As professoras Maria Inês Mascarenhas Jobim e Ender Oberst, pela colaboração, estímulo, preocupação e amizade.

Aos colegas do Reprolab, que muito me ensinaram.

Aos estagiários do Reprolab, pelo trabalho, amizade e compreensão.

As secretárias da Pós-graduação, sempre preocupadas.

Ao colega Eduardo Malschitzky, pelo incentivo e cedência dos animais.

À prof Petra Gabarde, pelo valioso empréstimo do BAIXINHO.

À professora Vera pelo auxílio na análise estatística.

À Dra. Ana Mattos, pelo não menos importante auxílio nas correções.

À CAPES, pela bolsa.

Enfim a todos que me auxiliaram na execução deste projeto e incentivando acreditaram em sua execução.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Inseminação Artificial.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Plasma Seminal.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1 O plasma seminal na preservação do sêmen.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2 Efeito do plasma seminal no útero.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Proteínas do plasma seminal.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Avaliação Espermática.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.1 Motilidade espermática.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.2 Morfologia espermática.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.3 Teste de funcionalidade de membrana.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4.4 Teste de integridade de membrana.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5 Centrifugação.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Diluentes do sêmen.....</b>	<b>16</b>
<b>2.7 Resfriamento do sêmen.....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Coleta de sêmen.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Exame do sêmen.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.1 Exame Macroscópico.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2 Motilidade espermática.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.3 Determinação da concentração espermática.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.4 Teste de integridade de membrana- CFDA/PI.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.5 Teste de funcionalidade membrana- Teste hiposmótico.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Diluentes.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.1 Leite desnatado UHT.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.2 Leite-glicose.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Resfriamento do sêmen.....</b>	<b>23</b>

<b>3.5 Técnica da eletroforese.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.1 Determinação de proteínas totais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2 Eletroforese bidimensional.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2.1 Primeira dimensão.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2.2 Segunda dimensão.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.3 Quantificação das bandas protéicas.....</b>	<b>29</b>
<b>4 EXPERIMENTOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Experimento I.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.1 Animais.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.2 Diluentes.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.3 Delineamento experimental.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.4 Análise estatística.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.5 Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.6 Discussão.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Experimento II.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.1 Animais.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.2 Delineamento Experimental.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.3 Análise Estatística.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.4 Resultados.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.5 Discussão.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Experimento III.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.1 Animais.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.2 Delineamento experimental.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.3 Análise estatística.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.4 Resultados.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.5 Discussão.....</b>	<b>64</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>67</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Componentes do gel de primeira dimensão.....	25
Tabela 2. Componentes do gel de segunda dimensão ( <i>SDS-PAGE</i> ).....	27
Tabela 3- Valores médios de motilidade total às 0h, 24h, 48h e 72 h de amostras de sêmen resfriado contendo 0%, 2,5%, 5% e 10% de plasma no diluente.....	32
Tabela 4- Valores médios de motilidade progressiva de sêmen equino resfriado nas 0h, 24h, 48h e 72h contendo 0%, 2,5%, 5% e 10 % de plasma seminal.....	33
Tabela 5- Valores médios de espermatozóides, diluídos e resfriados, com membrana funcional às 0h, 24h, 48h e 72h de observação, contendo diferentes concentrações de plasma seminal.....	34
Tabela 6 – Valores médios de espermatozóides eqüinos com a membrana íntegra às 0h, 24h, 48h e 72h com 0%, 2,5%, 5% e 10% de plasma seminal.....	35
Tabela 7- Valores médios de espermatozóides com lesão de acrossoma às 0h, 24h, 48h e 72 h de amostras contendo diferentes concentrações de plasma seminal.....	36
Tabela 8 Valores médios de motilidade total, de sêmen eqüino resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento	37
Tabela 9- Valores médios de motilidade progressiva, de sêmen equino resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	37
Tabela 10 – Valores médios de espermatozóides com membrana funcional, de sêmen equino resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	38
Tabela 11 –Valores médios de espermatozóides com membrana íntegra de sêmen equino, resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	39

Tabela 12 –Valores médios de espermatozóides com acrossoma danificado de sêmen eqüino, resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	39
Tabela 13- Parâmetros reprodutivos dos garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen.....	45
Tabela 14. Peso molecular (PM), ponto isoelétrico (pI) e densidade óptica das proteínas do plasma seminal dos reprodutores eqüinos conforme a fertilidade.....	48
Tabela 15- Frequência de aparecimento das bandas protéicas 3, 5, 17, 19 e 31 conforme a fertilidade dos garanhões.....	49
Tabela 16- Motilidade total do sêmen de garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen sem plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	57
Tabela 17- Motilidade total média do sêmen de garanhões de alta qualidade espermática acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	58
Tabela 18 – Motilidade total média do sêmen de garanhões de baixa qualidade espermática acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	58
Tabela 19- Motilidade progressiva do sêmen de garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen sem plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	59
Tabela 20- Motilidade progressiva média do sêmen de garanhões de alta qualidade espermática, acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.	60
Tabela 21- Motilidade progressiva média do sêmen de garanhões de baixa qualidade espermática, acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento	60
Tabela 22- Valores médios de espermatozóides com a membrana funcional de garanhões de alta qualidade espermática acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	61



Tabela 23- Valores médios de espermatozóides eqüinos com a membrana funcional de ganhões de baixa qualidade espermática acrescidos de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriados a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	<b>62</b>
Tabela 24- Valores médios de espermatozóides com a membrana íntegra de ganhões de alta qualidade espermática, acrescidos de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriados a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	<b>63</b>
Tabela 25- Valores médios de espermatozóides com a membrana íntegra de ganhões de baixa qualidade espermática, acrescidos de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriados a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.....	<b>63</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Representação esquemática da primeira dimensão.....	<b>26</b>
Figura 2. Representação esquemática da segunda dimensão.....	<b>28</b>
Figura 3. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal eqüino .....	<b>47</b>

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Área de concentração Fisiopatologia da Reprodução  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### A CONCENTRAÇÃO, A COMPOSIÇÃO E A QUALIDADE DO PLASMA SEMINAL NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO A +4°C

AUTOR: FREDRICO LANÇA SCHMITT  
ORIENTADOR: RODRIGO COSTA MATTOS  
CO-ORIENTADORES: MARIA INÊS M. JOBIM E ENEDER R. OBERST

O presente trabalho constou de três experimentos. O primeiro objetivou verificar a influência de diferentes concentrações de plasma seminal e de dois diluentes na motilidade e na integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides equinos resfriados. Para tanto, foram utilizados 4 garanhões, comprovadamente férteis e em atividade sexual. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado, diluído 1:2 com EDTA-glicose, dividido em oito alíquotas e centrifugado a 600g, por 10 minutos, para remoção do plasma seminal. O *pellet* de cada alíquota foi ressuspenso com um determinado volume do plasma seminal, previamente removido e acrescido de um determinado volume de um dos dois diluentes (leite desnatado UHT ou leite desnatado-glicose) até atingir uma concentração final entre 40 e 50x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, contendo as seguintes concentrações finais de plasma seminal: 0%, 2,5%, 5% e 10%. Imediatamente após a diluição, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva e total e funcionalidade e integridade da membrana plasmática. A seguir, os oito frascos contendo o sêmen, com um volume aproximado de 12 ml cada, foram resfriados em câmara a +4°C a uma taxa de resfriamento de 0,3°C/min, sendo o sêmen novamente avaliado às 24, 48 e 72 horas.

O segundo experimento objetivou verificar o perfil protéico do plasma seminal de garanhões de alta fertilidade e de baixa fertilidade. Para tanto, foram utilizados 4 garanhões, sendo 2 com boa qualidade de sêmen e dois com baixa qualidade de sêmen. Após a coleta o sêmen foi centrifugado duas vezes a 3000g por 20 minutos para retirar o plasma seminal e este foi congelado a -196°C. No momento da realização da

eletroforese bidimensional, o plasma foi descongelado à temperatura ambiente, novamente centrifugado a 10000g por 1 hora, e sua proteína mensurada.

O terceiro experimento objetivou verificar a influência do plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática na motilidade e integridade e funcionalidade de membrana plasmática de espermatozóides de garanhões com alta qualidade espermática e vice-versa. Para tanto, foram utilizados 4 garanhões, dois com alta qualidade (AQ) e dois com baixa qualidade de sêmen (BQ). Os garanhões tiveram seu sêmen previamente coletado para realizar um banco de plasma seminal. Para tanto, o sêmen foi centrifugado duas vezes a 3000g por 20 minutos, dividido em alíquotas de 1,5 ml, identificado e congelado a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Quando da utilização, o plasma seminal foi descongelado em banho-maria a  $+37^{\circ}\text{C}$ . Foram realizadas 5 coletas de sêmen de cada garanhão. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado e diluído 1:2 com EDTA-glicose, dividido em cinco alíquotas e centrifugado a 600g, por 10 minutos, para remoção do plasma seminal. O *pellet* de cada alíquota recebeu com uma determinada quantidade de plasma seminal, do banco de plasma, e um determinado volume de Leite UHT, até atingir uma concentração final entre 40 a  $50 \times 10^6$  espermatozóides/ml. Nos garanhões de alta e de baixa qualidade de sêmen, foi acrescido ao *pellet*, após a centrifugação, plasma seminal de garanhões de baixa (BQ) e de alta (AQ) qualidade de sêmen, em concentrações finais de 0%, 2,5% e 5%. Imediatamente após a diluição, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva e total e funcionalidade e integridade de membrana plasmática. A seguir, os dez frascos contendo o sêmen, com um volume aproximado de 12 ml cada, foram resfriados em incubadora, a  $+4^{\circ}\text{C}$  e reavaliado às 24h, 48h e 72h horas.

Concluiu-se que concentrações de até 5% de plasma seminal não afetam a motilidade, a funcionalidade e a integridade de membrana plasmática dos espermatozóides; concentrações de 2,5% de plasma seminal provenientes de garanhões de alta qualidade de sêmen melhoram a motilidade espermática de garanhões de baixa qualidade de sêmen; concentrações de 2,5% de plasma seminal melhoram os percentuais de funcionalidade e integridade de membrana. As bandas protéicas **5** e **19** do plasma seminal não foram identificadas nos garanhões de baixa qualidade de sêmen; as bandas

protéicas **3** e **17** apresentaram densidade óptica superior nas amostras de garanhões de baixa qualidade de sêmen, enquanto que a banda protéica **31** foi superior nos animais de alta qualidade, constituindo-se em prováveis marcadores de qualidade do sêmen. A utilização de leite desnatado UHT proporcionou melhores resultados de motilidade e integridade de membrana, em comparação ao leite-glicose.

PALAVRAS-CHAVE: sêmen eqüino; plasma seminal, sêmen resfriado, eletroforese, proteínas.

**ABSTRACT**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Área de concentração Fisiopatologia da Reprodução  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**SEMINAL PLASMA CONCENTRATION, COMPOSITION AND QUALITY ON  
THE PRESERVATION OF EQUINE SEMEN AT +4°C**

AUTOR: FREDRICO LANÇA SCHMITT  
ORIENTADOR: RODRIGO COSTA MATTOS  
CO-ORIENTADORES: MARIA INÊS M. JOBIM E ENEDER R. OBERST

The present study included three experiments. The first one aimed to detect the influence of different equine seminal plasma concentrations and of two different extenders on equine sperm motility and plasmatic membrane integrity and functionality. Four proven fertile, sexually active stallions were used. Sperm was evaluated immediately after collection, diluted 1:2 with EDTA-glucose, divided in eight samples and centrifuged at 600g for 10 minutes for supernatant removal. Each pellet received a certain volume of the previously removed seminal plasma, plus a certain volume of extender (UHT skim milk or skim milk-glucose) so that a final sperm count between 40 and 50x10<sup>6</sup> sperm/ml was reached, with the following seminal plasma concentrations: 0%, 2.5%, 5% and 10%. Immediately after dilution, sperm was evaluated for progressive and total motility and membrane integrity and functionality. Afterwards, the eight flasks containing about 12 ml sperm each were cooled in a +4°C chamber at a cooling rate of 0.3°C/minute. Sperm was evaluated again after 24, 48 and 72h.

The second experiment aimed to determine seminal plasma proteins in high and low fertility stallions. Four stallions were studied, two with high quality and two with low quality semen. After collection, semen was centrifuged twice at 3000g for 20 minutes for seminal plasma removal, which was frozen at -196°C. At the moment of performing bi-dimensional electrophoresis, seminal plasma was thawed at room temperature, centrifuged at 10000g for 60 minutes and protein content was evaluated.

The third experiment aimed to determine the influence of seminal plasma from low quality semen stallions on sperm motility and membrane integrity and functionality from high quality semen stallions, and vice-versa. Four stallions were used, two of high quality (HG) and two of low quality (LQ) semen. Their seminal plasma was collected previously in order to make a sperm bank. For that, semen was centrifuged twice at 3000g for 20 minutes, divided in 1.5 ml samples, identified and frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . For use, seminal plasma was thawed in water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ . Five ejaculates from each stallion were used. Immediately after collection semen was evaluated and diluted 1:2 with EDTA-glucose, divided in five samples and centrifuged at 600g for 10 minutes for plasma removal. Each pellet received a certain seminal plasma volume (from the seminal plasma bank), plus a certain volume of UHT milk, so that a final sperm count between  $40$  and  $50 \times 10^6$  sperm/ml was reached. Pellets of stallions with high and low quality semen received seminal plasma from stallions with high (HQ) and low quality (LQ) semen at final concentrations of 0%, 2.5% and 5%. Immediately after dilution, semen was evaluated for sperm progressive and total motility and membrane integrity and functionality. Afterwards, the ten flasks containing about 12 ml semen were cooled in a  $4^{\circ}\text{C}$  chamber and evaluated again after 24, 48 and 72h.

It was concluded that concentrations of until 5% seminal plasma do not affect sperm motility or membrane integrity and functionality; concentrations of 2.5% seminal plasma from high quality semen stallions improve sperm motility in low quality semen stallions; concentrations of 2.5% seminal plasma improve sperm membrane integrity and functionality rates. Seminal plasma protein bands **5** and **19** were not found in low quality semen stallions; protein bands **3** and **17** showed superior optical density in the samples from low quality semen stallions, while protein band **31** was superior in high quality semen animals, becoming probable semen quality markers. The use of UHT skim milk offered better results concerning sperm motility and membrane integrity, in comparison to milk-glucose.

**KEYWORDS:** equine semen; seminal plasma; cooled semen; electrophoresis; proteins.

## 1. INTRODUÇÃO

O equino é a espécie animal que maior número de empregos gera mundialmente, pela tecnificação de sua criação e pelo alto valor agregado de seus produtos. As recentes conquistas brasileiras nas pistas internacionais, tanto de corrida como no salto, tornaram o cavalo um produto de exportação, gerando divisas para o nosso país. O Rio Grande do Sul é o principal pólo criatório de equinos de competição no Brasil. Para manter a criação nacional e estadual competitiva é necessário entre outras medidas utilizar modernas biotécnicas para aprimorar a reprodução e diminuir os custos da produção.

A inseminação artificial com sêmen fresco, largamente utilizada na reprodução equina, é uma dessas técnicas. Sua utilização oferece varias vantagens sobre a monta natural, como a otimização reprodutiva do garanhão, a redução de riscos durante a cópula e a redução de transmissão de doenças venéreas. Esta técnica, atualmente no Brasil, é permitida por diversas associações de raça (Mattos, 1995), e tem seus índices de concepção, com sêmen fresco, próximos ou até superiores aos da monta natural (Mattos *et al.*, 1996).

O resfriamento e transporte de sêmen a temperatura de +5°C para posterior inseminação de éguas é uma pratica rotineira na criação de cavalos (Jasko *et al.*, 1991; Hathaway *et al.*, 1992 ; Mattos, 1995; Bredford *et al.*, 1995), apresentando vantajosos resultados quando comparados aos obtidos com o sêmen congelado, visto o alto custo do processo de criopreservação e a baixa fertilidade do sêmen de vários garanhões expostos a esta técnica (Varner *et al.*, 1987; Klug, 1989)

A utilização de um diluente adequado é essencial para a proteção do espermatozóide equino durante sua estocagem (Batellier *et al.*, 1997). Inúmeros são os diluentes utilizados para sêmen equino, sendo a gema de ovo e o leite os mais utilizados (Pickett, 1992), pois protegem os espermatozoides dos efeitos nocivos causados pelo rápido resfriamento do sêmen (Varner *et al.*, 1987). A ação protetora do leite é dada pelas suas lipoproteínas, que estabilizam as membranas dos espermatozoides, permitindo sua adaptação às baixas temperaturas (Watson, 1991; Amann & Graham, 1992). No entanto, é importante regular a osmolalidade e o pH do diluente (Pickett, 1992) para que fiquem compatíveis com a dos espermatozoides.

O sêmen resfriado apresenta índices de fertilidade semelhantes aos do sêmen fresco (Keller, 1998) quando utilizado nas primeiras horas após a coleta. No entanto, sua fertilidade cai drasticamente após as 24 horas. A presença do plasma seminal é apontado como uma das causas da baixa fertilidade do sêmen resfriado por mais de 24 horas.

O plasma seminal, quantitativa e qualitativamente, depende da secreção do, epidídimo, da ampola do canal deferente, da próstata, das vesículas seminais e glândulas bulbo-uretrais (Magestrini *et al.*, 1995). Sua presença no ejaculado causa um efeito



negativo na sobrevivência dos espermatozoides eqüinos (Magestrini *et al.*, 1995), principalmente quando congelado ou estocado a +5°C em concentrações elevadas (Jasko *et al.*, 1991; Hathaway *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 2001) e 48 horas após a coleta (Pickett *et al.*, 1975).

Existem vários fatores desconhecidos no plasma seminal que reduzem a motilidade espermática (Jasko *et al.*, 1991), assim como fatores que causam distúrbio na viabilidade espermática e na sua capacidade de fertilização (Varner *et al.*, 1987). O plasma seminal, por outro lado, contém componentes que são importantes para a sobrevivência espermática, é o veículo do ejaculado, do diluente e contém substratos metabolizáveis pelo espermatozoides (Brandon *et al.*, 1999), sendo a sua completa retirada, portanto, não aconselhável (Pickett *et al.*, 1975).

O procedimento normalmente adotado para a retirada do plasma seminal é a centrifugação em baixa rotação, não sendo esta deletéria à sobrevivência dos espermatozoides (Pickett *et al.*, 1975), já que altas forças e pôr tempo superior a dez minutos causam danos a membrana plasmática (Keller, 1998).

A fração de plasma ideal a ser mantida no sêmen para sua melhor preservação vem sendo estudada (Pickett *et al.*, 1975; Varner *et al.*, 1987 ; Hathaway *et al.*, 1992 ; Bedford *et al.*, 1995), assim como os efeitos deletérios causados à membrana espermática (Aurich *et al.*, 1996).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial em eqüinos foi relatada, pela primeira vez, em textos árabes, em 1322: supostamente, um chefe árabe roubou de um rival o sêmen de um garanhão e inseminou sua égua, ocorrendo o nascimento de um produto. O primeiro relato científico, documentado, do uso desta técnica foi realizado em 1776 por Lazzaro Spallanzani, que inicialmente trabalhou com cães e posteriormente, avaliou o método em eqüinos, incluindo o resfriamento do sêmen (Brinsko & Varner, 1992). A sua popularização ocorreu a partir do fim do século XIX e massificou-se com a implantação de grandes programas na Rússia (Klug, 1993) e na China (Brinsko & Varner, 1992), a partir dos anos 30.

A inseminação artificial com sêmen fresco, permitida por diversas associações de raça (Mattos, 1995), além de ser uma técnica simples e amplamente difundida, maximiza a utilização do garanhão, reduz a transmissão de doenças venéreas e o risco de acidentes no momento da cópula (Brinsko & Varner, 1992), assim como diminui os custos e o estresse do transporte da égua e do potro até o garanhão (Squires *et al.*, 1988).

Seus índices de concepção, com sêmen fresco, apresentam resultados iguais ou superiores aos obtidos com a monta natural (Mattos *et al.*, 1996). Palmer (1984) relatou índices de prenhez por ciclo similares para monta natural (64%) e inseminação artificial com sêmen puro (76%). No entanto, Mattos e Cavalheiro (1988), utilizando 225 ciclos, durante três temporadas, obtiveram taxa de prenhez por ciclo significativamente superior ( $p < 0,05$ ) com a utilização da inseminação artificial com sêmen fresco (78,7%), quando comparada à obtida com a monta natural (65,3%).

Os índices de prenhez obtidos por monta natural (78%) e por inseminação artificial com sêmen diluído em leite desnatado e preservado por 24h a 96h entre 0°C

e +5°C, foram similares: 24h (71,4%), 48h (85%), 72h (50%) e 96h (67%) (Hughes e Loy, 1970). Resultados similares foram obtidos por Mattos (1995), que comparou a fertilidade do sêmen diluído preservado a +4°C por 24h com a do sêmen fresco diluído utilizado até uma hora após a coleta. Tendo a taxa de prenhez aos 23 dias como medida de referência, o autor não encontrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos avaliados. Estes resultados foram confirmados por Keller *et al.* (2001), que compararam os índices de prenhez obtidos após inseminação utilizando sêmen fresco e resfriado a +5°C por 24 h. Foram utilizados 58 ciclos de éguas Árabes com idades variando de 4 a 18 anos e três garanhões da mesma raça. Não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos índices de prenhez entre as inseminações realizadas com sêmen fresco (71,4%) e as efetuadas com sêmen preservado por 24 h a +5 °C (83%).

## 2.2 PLASMA SEMINAL

O plasma seminal equino é composto pelas secreções do epidídimo, ampola do canal deferente, próstata, vesículas seminais e glândulas bulbo-uretrais (Mann, 1975; Varner *et al.*, 1987). As secreções do trato reprodutivo do garanhão podem ser divididas em diferentes frações: pré-secreção fração rica do ejaculado e fração pobre ou pós-espermática (Tischner *et al.*, 1974; Mann, 1975; Mann & Lutwak-Mann, 1981; Varner *et al.*, 1987).

A pré-secreção provém das glândulas uretrais e bulbo-uretrais, é rica em cloreto de sódio e tem a função de limpeza da uretra.

A fração rica do ejaculado tem alta concentração de espermatozóides suspensos em secreções do epidídimo, ampola de canal deferente, e próstata (Mann, 1975). A ergotioneína, produzida na ampola do canal deferente, tem a função de proteger os espermatozóides contra agentes oxidantes e peroxidantes (Mann, 1975). A glicerilfosforilcolina, produzida no epidídimo, tem papel importante no metabolismo dos lipídios (Mann, 1964) e na maturação dos espermatozóides

(Magestrini *et al.*, 1996), podendo ser utilizada como identificador da função secretória do epididimo (Klug, 1982).

A fração pobre contém baixa concentração de espermatozóides (Keller *et al.*, 2001), sendo composta por gel e é rica em ácido cítrico das vesículas seminais (Kneissl, 1993).

O plasma seminal contém fatores estimuladores da motilidade espermática que podem ser divididos em dois grandes grupos. Um deles seria constituído por fatores de ativação catalítica, como certos íons, nucleotídeos e ativadores específicos, provavelmente de origem protéica, encontrados em diversas glândulas acessórias, principalmente na próstata. O outro grupo seria formado por nutrientes que fornecem a energia metabólica exigida para a motilidade e a sobrevivência dos espermatozóides (Mann & Lutwak-Mann, 1981). O plasma seminal é importante, também, por aumentar o volume do ejaculado, permitindo uma melhor distribuição dos espermatozóides no útero da égua (Amann & Graham, 1992).

O plasma seminal não é um meio ideal para armazenar espermatozóides (Jasko *et al.*, 1991). Diversos trabalhos em equínos indicam que altas concentrações de plasma seminal podem ter efeitos deletérios sobre a motilidade espermática após armazenamento por períodos prolongados (Piquet *et al.*, 1975; Varner *et al.*, 1987; Jasko, 1991, Magestrini *et al.*, 1995) .

### 2.2.1 O plasma seminal na preservação do sêmen

O efeito do plasma seminal na preservação do sêmen vem sendo estudado por vários pesquisadores. Picket *et al.* (1975) realizaram uma série de experimentos para determinar a influência da porcentagem de plasma seminal sobre a motilidade espermática pré e pós-congelamento. A motilidade pré-congelamento, avaliada 75 minutos após a diluição, foi significativamente mais baixa nas amostras sem plasma seminal, quando comparada a aquelas contendo 2% e 10%. No entanto, a motilidade pós-congelamento foi menor nas amostras sem plasma seminal e naquelas que continham 2%.

Em outro experimento, foram comparadas a motilidade e a velocidade espermática de amostras contendo ou não plasma seminal, retirado por centrifugação (Padilla & Foote, 1991). Foram utilizados 16 ejaculados de 4 garanhões. Cada ejaculado foi dividido em duas amostras e cada uma diluída em leite desnatado-glicose (Kenney *et al.*, 1975) ou em leite desnatado-glicose-Tyrode modificado (TYR). Cada uma dessas amostras foi dividida em duas alíquotas iguais, sendo uma

armazenada a +4°C e a outra centrifugada e ressuspensa no mesmo diluente, observando-se uma concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozóides/ml. As alíquotas diluídas foram, também, conservadas a +4°C. A motilidade de cada uma das quatro alíquotas foi avaliada às 0, 24, 48 e 72 h. O sêmen centrifugado e diluído em TYR obteve os melhores percentuais de motilidade. Os autores acreditam que a centrifugação removeu os componentes deletérios do plasma seminal e a ressuspensão com diluente TYR forneceu os nutrientes essenciais à sobrevivência dos espermatozóides.

Em estudo realizado por Keller *et al.* (2001), foi avaliada a influência da concentração de plasma seminal na manutenção da motilidade espermática o sêmen preservado a +4°C. Após a coleta, o sêmen foi diluído em leite desnatado com três diferentes concentrações de plasma seminal (1,95%, 6,29% e 17,78%), resfriado a +4°C e examinado às 24, 48 e 72 horas. A fração contendo 1,95% de plasma seminal apresentou motilidade progressiva e total significativamente superior ( $p < 0,05$ ) em relação à que continha 17,78% nas 24 h e 48h.

O efeito de diferentes concentrações de plasma seminal sobre a motilidade espermática foi testado por Jasko *et al.* (1992). Foi preparado um *pool* de plasma seminal que era adicionado ao leite desnatado-glicose (LD) na proporção de 5%, 10% e 20% e uma amostra sem plasma seminal (0%). Amostras de sêmen foram centrifugadas e, após a retirada do sobrenadante, ressuspensas nos diluentes com as diversas concentrações de plasma seminal. Uma amostra controle diluída em LD-glicose com  $25 \times 10^6$  espermatozóides/ml foi centrifugada e ressuspensa no próprio sobrenadante (porcentagem média de plasma seminal = 13,5%). Todas as amostras foram resfriadas a +5°C por 72 horas. As amostras centrifugadas com 5% a 20% de plasma seminal tiveram motilidade progressiva e total semelhante ao controle em todos os tempos de armazenamento. A amostra centrifugada sem adição de plasma seminal teve motilidade progressiva inferior ( $p < 0,05$ ) a partir de 24 h de armazenamento.

Por outro lado, Jasko *et al.* (1991) testaram o efeito da centrifugação, seguida da retirada do plasma seminal, sobre a motilidade espermática em amostras resfriadas a +5°C por 24 horas. Foram utilizados 36 ejaculados de 12 garanhões. O

mesmo ejaculado foi diluído em LD-glicose até um volume de 40ml e centrifugado a 500g/18min. Após a centrifugação e a retirada do sobrenadante, uma alíquota foi ressuspendida no próprio sobrenadante e a outra em LD-glicose em 3 diluições diferentes: 100, 50 e 20 x10<sup>6</sup> espermatozóides/ml. A análise computadorizada da motilidade após 24h revelou que as amostras sem plasma seminal tiveram melhor motilidade (p<0,05) nas três diluições.

A influência de quatro concentrações de plasma seminal (0%, 5%, 10% e 15%) sobre a motilidade espermática e a integridade do acrossoma pré e pós-congelamento foram estudadas por Ahlemeyer (1991). No estudo, não se observaram diferenças significativas quanto à motilidade progressiva e defeitos de acrossoma entre as quatro concentrações de plasma seminal antes do congelamento. Houve um aumento nos defeitos de acrossoma pós-congelamento, mas a diferença entre as amostras não foi significativa. As amostras contendo 5% e 10% de plasma seminal apresentaram motilidade pós-congelamento significativamente superior em relação às amostras contendo 0% e 15% de plasma seminal.

Em outro experimento, Vianna *et al.* (2002) objetivaram verificar a influência do plasma seminal na motilidade espermática após o resfriamento (4°C) e após o congelamento. Para tanto, utilizaram 4 garanhões, dois com motilidade espermática superior pós-resfriamento (75% e 73% de motilidade progressiva) e pós-congelamento (35% e 40% de motilidade progressiva) e dois considerados com baixa motilidade após o resfriamento (40% e 46%) e após o congelamento de sêmen (3% e 1%). O sêmen dos 4 reprodutores foi centrifugado e 90% do plasma seminal retirado. O sêmen dos garanhões considerados “bons” foi ressuspendido com o plasma dos garanhões considerados “ruins” até uma concentração de 200x10<sup>6</sup> espermatozóides/ml e diluído. Procedeu-se da mesma forma com os garanhões considerados “ruins”, a cujos espermatozóides se acrescentou o plasma dos garanhões considerados “bons”. As amostras de sêmen foram resfriadas e congeladas. Os autores observaram uma melhora na motilidade progressiva dos espermatozóides dos garanhões considerados “ruins” após a adição do plasma seminal daqueles considerados “bons”, tanto no sêmen resfriado como no congelado, e concluíram que o plasma seminal tem influência na motilidade de células

espermáticas nos diferentes tratamentos térmicos impostos no processamento de sêmen.

### 2.2.2 Efeito do plasma seminal no útero

O plasma seminal contém uma série de substâncias, não bem caracterizadas, que podem ser responsáveis pela contração da musculatura lisa do trato genital feminino (Overstreet & Tom, 1982). Utilizando espermatozóides imóveis suspensos em plasma seminal ou em solução salina, coelhas foram abatidas 15 e 30 minutos após a inseminação. Os autores observaram presença de espermatozóides no oviduto 15 minutos após a inseminação no grupo do plasma seminal, enquanto que, no grupo da solução salina, não foram encontradas células espermáticas no oviduto, nem aos 15, nem aos 30 minutos.

Na égua, a contração da musculatura uterina é importante na limpeza física do útero, assim como no transporte dos espermatozóides até o oviduto. Por outro lado, o plasma seminal equino reduz a quimiotaxia *in vitro* dos neutrófilos equinos (Troedsson, 1999). A remoção do plasma seminal, no processo de congelamento do sêmen, poderia explicar a forte reação inflamatória que ocorre no útero após a inseminação com sêmen congelado (Troedsson, 1995). Esta reação pode ser causada, também, pela falta de estímulo na contração uterina, ocasionada pela ausência de plasma seminal no sêmen congelado, aumentando a chance de ocorrência de uma endometrite persistente (Katila, 1997).

No entanto, Fiala *et al.* (2002) observaram que o plasma seminal provoca também uma reação inflamatória uterina. Compararam a reação inflamatória de éguas que receberam infusão intra-uterina de 20 ml de plasma seminal com um grupo controle, que nada recebeu. Foram utilizadas 70 éguas em estro, aleatoriamente distribuídas, que foram abatidas 2, 4 e 24 h após a infusão. O trato genital foi removido e lavado com 50ml de PBS, por três vezes. Verificaram que as éguas que receberam o plasma tiveram uma resposta inflamatória até as 24h após a infusão, sendo o pico às 4h após a infusão. O grupo controle teve uma reação inflamatória no útero significativamente inferior ( $p < 0,02$ ) aos demais.

## 2.3 PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL

As proteínas do plasma seminal são parcialmente originárias do plasma sanguíneo e parcialmente sintetizadas e secretadas pelo testículo (Kato *et al.*, 1985), epidídimo (Turner & Reich, 1987) e vesículas seminais (Manjunath *et al.*, 1994).

Em bovinos, num estudo onde foi investigada a relação da fertilidade com as proteínas do plasma seminal, duas proteínas, a pI 6,2 (26 KDa) e a pI 4,5 (55 Kda) foram relacionadas com touros de alta fertilidade, e outras duas, a pI 4,1 (16 KDa) e a pI 6,7 (16 KDa), foram encontradas principalmente no plasma seminal de animais de baixa fertilidade (Killian *et al.*, 1993).

Nos eqüinos, foram identificadas uma série de proteínas no plasma seminal Brandon *et al.* (1999) correlacionaram 3 proteínas com a fertilidade (SP-2, SP-3, SP-4). Estas ocorrem em alta concentração em cavalos classificados como de baixa fertilidade.

## 2.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

### 2.4.1 Motilidade Espermática

A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação da preservação de espermatozóides e constitui um elemento importante na estimativa da viabilidade espermática (Kenney *et al.*, 1983, Varner *et al.*, 1988; Pickett, 1992).

A avaliação da motilidade espermática tem por objetivo determinar a percentagem de espermatozóides totais com movimento em um ejaculado. No entanto, para se obter uma avaliação mais precisa, é possível avaliar a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, visto estes representarem alta fertilidade ( Pickett & Voss, 1972).



Alguns métodos foram descritos para estimar objetivamente a motilidade dos espermatozoides: fotomicrografia (Van Huffel *et al.*, 1985); videomicrografia (Varner *et al.*, 1991), espectrofotometria (Jasko *et al.*, 1989) e análise computadorizada (Amann & Picket, 1987). O método subjetivo de exame visual, utilizando microscópio óptico de contraste de fase e platina aquecida, é aceitável quando realizado por observador experiente (Varner *et al.*, 1991).

Entretanto, Jasko *et al.* (1992) encontraram que as características seminais melhor correlacionadas ( $p < 0,01$ ) com dados de fertilidade de garanhões Puro Sangue de Corrida e Standardbred foi a avaliação subjetiva da porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva ( $r=0,46$ ) e móveis totais ( $r=0,40$ ), porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais ( $r=0,36$ ) e porcentagem de espermatozoides progressivos estimada por análise computadorizada ( $r=0,34$ ). Considerando que a motilidade é um componente indispensável do mecanismo de fertilização, sua perda irreversível pode ser considerada uma perda de função celular (Mattos, 1995). Por outro lado, a manutenção da motilidade não implica integridade celular completa (Varner *et al.*, 1988).

#### 2.4.2 Morfologia Espermática

A avaliação isolada da morfologia espermática pode não indicar o potencial de fertilidade de um ejaculado. No entanto, pode indicar se o potencial de fertilidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagens de anormalidades espermáticas de primeiro e segundo grau (Dott, 1975). Relatos dos últimos 30 anos indicam que, quanto maior a porcentagem de espermatozoides anormais, menor a fertilidade de sêmen. Células com defeito de cabeça e acrossoma estão associadas com infertilidade (Bielanski & Kaczmariski, 1979).

As alterações primárias ocorrem durante o processo de espermatogênese e as alterações de segundo grau ocorrem durante o percurso dos espermatozoides pelos ductos seminíferos, epidídimo e durante o ejaculado (Blom, 1973).

De acordo com Bielanski (1975), a presença de mais de 10% de anormalidades primárias, no garanhão, está relacionada à baixa fertilidade, enquanto

garanhões apresentando somente anormalidades secundárias, mesmo superando 30% de alterações em um ejaculado, não apresentam necessariamente baixa fertilidade.

As características morfológicas dos espermatozóides eqüinos diferem das de outras espécies, como a cabeça assimétrica com um pequeno acrossoma e a implantação abaxial da cauda (Bielanski & Kaczmarek, 1979). Estes autores encontraram relatos indicando que, quanto maior a porcentagem de espermatozóides morfológicamente anormais, menor a fertilidade do garanhão.

#### 2.4.3 Teste de Funcionalidade de Membrana - Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico foi desenvolvido por Jeyendran *et al.* (1984), com a finalidade de avaliar a funcionalidade da membrana plasmática em espermatozóides humanos. A membrana plasmática do espermatozóide tem por característica permitir o transporte de moléculas seletivas (Drevius & Eriksson, 1966; Drevius, 1972), as quais provocam um aumento de volume ou “edemaciamento” do espermatozóide, particularmente visível na cauda. Isto ocorre devido ao fato de a membrana plasmática que envolve a cauda ser mais frouxamente aderida que a membrana que envolve a cabeça, permitindo que esta se enrole com facilidade. Segundo Jeyendran *et al.* (1984), é possível relacionar o enrolamento da cauda com uma boa funcionalidade da cabeça, havendo uma correlação positiva entre caudas enroladas e penetração de oócitos de hamster.

A capacidade da cauda espermática de enrolar na presença de solução hiposmótica demonstra que está ocorrendo transporte de água através da membrana, indicando função intacta da membrana (Drevius & Eriksson, 1966).

O estudo da funcionalidade da membrana é de grande importância, tendo sido relatadas correlações positivas, em sêmen humano, entre a porcentagem de enrolamento de cauda em espermatozóides e sua motilidade (Hideki *et al.*, 1993). A integridade da membrana também é importante no processo de capacitação espermática.

Sabendo-se que a membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio, o estudo da funcionalidade soma-se aos parâmetros

tradicionais de avaliação do sêmen para determinar índices de fertilidade. Além das diferenças individuais na preservação do sêmen de garanhões, pode-se considerar que o comportamento osmótico do espermatozóide também influencia na preservação do sêmen (Lagares, 1995; Kohne *et al.*, 1995).

A utilização do teste hiposmótico para determinar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides eqüinos foi utilizada por Keller (1998). O autor comparou a funcionalidade da membrana de espermatozoides frescos e centrifugados. Foram utilizadas duas concentrações para o teste hiposmótico, uma solução de lactose a 50 mOsmol/kg e outra a 100 mOsmol/kg. Observou-se que as amostras centrifugadas apresentaram menor funcionalidade de membrana na solução 50 mOsmol/kg, do que as amostras não centrifugadas. No entanto, não se observaram diferenças significativas na solução de 100mOsmol/kg entre as amostras testadas. Não foi encontrada correlação entre o teste hiposmótico e a motilidade espermática progressiva e total.

Lagares *et al.* (2000), modificaram a técnica desenvolvida por Lomeo & Giambérsio (1991), diluindo sêmen eqüino com água destilada na proporção de 1:3 (100mOsmol/kg), com o objetivo de verificar o efeito de três diluentes para o sêmen eqüino resfriado. Os autores observaram altos percentuais de espermatozoides com membrana funcional ao utilizar os diluentes leite desnatado, diluente Kenney, diluente Tyrode e o diluente Glicina. O diluente leite desnatado proporcionou os melhores resultados na funcionalidade de membrana durante as 72 horas de armazenamento a + 5°C, em relação aos outros diluentes utilizados.

O teste hiposmótico foi utilizado por Vieira *et al.* (2002) para avaliar a funcionalidade de membrana de espermatozoides eqüinos diluídos em leite desnatado (LD), acrescido de diversos antimicrobianos. Os autores observaram perda significativa de funcionalidade de membrana nos espermatozoides diluídos em LD acrescido de 1000 mg/ml de gentamicina e nos espermatozoides diluídos com o mesmo diluente acrescido de 1000 mg/ml de amicacina e 1000 UI/ml de penicilina, quando comparados com aqueles que foram diluídos em LD, LD acrescido de 50 µg/ml de gentamicina e 50UI/ml de penicilina e em LD mais 1000 mg de sulfato de amicacina.

#### 2.4.4 Integridade de Membrana - Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (PI)

Garner *et al.* (1986) descreveram a utilização de duas colorações fluorescentes, em conjunto ou separadamente, para avaliar a integridade da membrana plasmática de suínos, bovinos, caninos, eqüinos, camundongos e humanos: a carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (PI).

A utilização conjunta do CFDA com o PI é considerada mais segura para avaliar a integridade de membrana do que a utilização isolada destes corantes (Harrison & Vickers, 1990). Quando utilizados separadamente, o PI é considerado mais confiável do que o CFDA (Baltes, 1993).

O espermatozóide é corado de verde pelo CFDA, através de esterases não específicas, que se transformam em carboxifluoresceína livre no interior da célula, ficando esta retida (Harrison & Vickers, 1990) nos espermatozoides com membrana íntegra (Haugland, 1992). O PI cora as células mortas de vermelho devido à permeabilidade alterada da membrana danificada (Johnson *et al.*, 1996).

Esta técnica tem como desvantagem a necessidade de ser realizada o mais rápido possível depois da aplicação do corante, pois a cor se perde devido à passagem dos compostos fluorescentes através da membrana (Johnson *et al.*, 1996).

#### 2.4.5 Eletroforese das proteínas do plasma seminal

O mapeamento e a identificação das proteínas do plasma seminal, através da técnica de eletroforese, vem sendo utilizado desde a década de 50 (Larson & Salisbury, 1954; Szumowski, 1956; Bennet, 1965). Primeiramente, foi realizada em soluções de sacarose (Larson & Salisbury, 1954), a qual foi substituída pelos géis de amido (Vesselinovicich, 1959). A técnica da eletroforese vem sendo aprimorada em géis de poliacrilamida (uni ou bidimensional) e vem sendo utilizada com sucesso até os dias de hoje.

A eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida representa uma técnica valiosa na separação e caracterização das proteínas. Através deste método, muitas proteínas do plasma seminal de várias espécies foram descritas e caracterizadas (Killian *et al.*, 1993; Desnoyers *et al.*, 1994; Frezer & Bicci, 1996; Mortarino, 1998; Flowers, 1998; Brandon *et al.*, 1999).

## 2.5 CENTRIFUGAÇÃO

A centrifugação é realizada com o objetivo de separar a fração de sêmen rica em espermatozóides do plasma seminal. Existem vários trabalhos sobre a influência da centrifugação na motilidade, morfologia e capacidade de fertilização das células espermáticas. Seus resultados, no entanto, são contraditórios. A maioria destes trabalhos estuda a influência do plasma seminal sobre o sêmen resfriado e congelado.

Alguns fatores como a força centrífuga e o tempo de duração da centrifugação (Pickett *et al.*, 1975), o diluente utilizado para centrifugação (Martin *et al.*, 1979; Cochran *et al.*, 1984; Wockerner *et al.*, 1990), a porcentagem de plasma seminal retirada com a centrifugação (Pickett *et al.*, 1975; Ahlmeyer, 1991; Jasko *et al.*, 1992; Kneissl, 1993) e o diluente utilizado na ressuspensão do sêmen após a centrifugação (Clay *et al.*, 1984) influenciam na qualidade do sêmen.

Macleod & Macgee (1950) descreveram o efeito negativo da centrifugação do sêmen equino sobre a motilidade espermática. Da mesma forma, testando o efeito da centrifugação sobre o sêmen, Jasko *et al.* (1991) compararam a motilidade de duas amostras, uma diluída em leite desnatado-glicose, centrifugada a 500g por 18 min e ressuspensa no próprio sobrenadante, e a outra diluída em leite desnatado-glicose e não centrifugada. As amostras foram resfriadas a +5°C por 24 h. Foi notada queda significativa na motilidade das amostras centrifugadas na hora zero, não se observando diferença nas 24 h.

Martin *et al.*, (1979) testaram um diluente à base de EDTA-glicose antes da centrifugação a 1000g, por 5 minutos. Neste trabalho, foi observada uma melhora na

motilidade das amostras diluídas centrifugadas em comparação com as não diluídas centrifugadas.

Utilizando diferentes forças de centrifugação, Papa *et al.* (1981) compararam a motilidade e a coloração supra-vital pós-congelamento. As amostras de sêmen foram diluídas em EDTA na proporção 1:1 e centrifugadas a 1000g por 5 ou 10 minutos, ou a 2000g por 2,5 min ou 5 min. Após a centrifugação, 90% do sobrenadante foi retirado e o centrifugado foi ressuspensionado em diluente de congelamento. Uma amostra controle não foi centrifugada. As amostras descongeladas centrifugadas apresentaram melhor motilidade total e maior porcentagem de células não coradas pela eosina. Não houve diferença estatística entre as forças de centrifugação.

A centrifugação em baixa rotação não é prejudicial ao espermatozóide (MacCall, 1969). Picket *et al.* (1975) compararam a motilidade de amostras centrifugadas a 370 e 829g por 5 min, não encontrando influência negativa da centrifugação sobre a motilidade pré e pós-congelamento. Os mesmos autores ao testarem a fertilidade de amostras de sêmen centrifugadas a 310g e não centrifugadas, não encontraram diferença significativa na taxa de prenhez aos 50 dias.

Baumgarte (1980) testou o efeito da centrifugação sobre a integridade da membrana da célula espermática. Foram comparadas amostras pré-diluídas com EDTA-glicose antes da centrifugação e amostras sem diluição prévia à centrifugação, assim como amostras de sêmen fresco. Não foi encontrada diferença significativa quanto à integridade do acrossoma na observação em microscópio de contraste de fase, já em microscopia eletrônica, foi observado aumento significativo de lesões de membrana nas amostras centrifugadas.

Testando o efeito da centrifugação sobre os espermatozoides, Keller (1998) observou melhores percentuais de motilidade progressiva nas amostras centrifugadas e armazenadas a +4°C, por 24h, 48h e 72h que nas amostras não centrifugadas. No entanto, observou que a centrifugação a 1000g provocou diminuição significativa da funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides logo após a centrifugação com EDTA-glicose.

## 2.6 DILUENTES DE SÊMEN

Os diluentes de sêmen são substâncias destinadas a proteger o espermatozóide de condições adversas e, conseqüentemente, prolongar sua vida (Pickett & Amann, 1987; Brinsko & Varner, 1992). São utilizados, também, para aumentar a viabilidade do sêmen de animais subfêrteis (Blanchard *et al.*, 1987), aumentar o volume da dose inseminante (Pickett & Amann, 1987) e auxiliar nas avaliações de amostras de sêmen (Kenney *et al.*, 1983).

A diluição do sêmen em meio apropriado diminui os efeitos negativos do plasma seminal (Padilla & Foote, 1991). Em geral, um diluente apropriado deve possuir pressão osmótica compatível com a dos espermatozóides, equilíbrio adequado de elementos minerais, substâncias capazes de neutralizar produtos tóxicos, uma combinação adequada de nutrientes, elementos que estabilizem sistemas enzimáticos e a integridade das membranas, além de conferir proteção contra o choque térmico (Pickett & Amann, 1987).

Para isso, os diluentes devem ter pH e pressão osmótica similares aos do sêmen (Pickett & Amann, 1987). A osmolalidade do fluido seminal é de aproximadamente 300 mOsmol/kg (Pickett *et al.*, 1976). Sendo assim, o diluente deve ter osmolalidade entre 300 e 400 mOsmol/kg, considerando-se como a ideal 350 mOsmol/kg (Varner *et al.*, 1991). O pH deve variar entre 6,7 e 7,2, sem interferir na viabilidade espermática durante o armazenamento (Brinsko & Varner, 1992).

Um dos diluentes mais utilizado para sêmen eqüino é o leite, talvez porque suas lipoproteínas atuam de forma semelhante às da gema de ovo na proteção da membrana plasmática (Amann & Graham, 1992). Proteínas do leite podem estabilizar os elementos protéicos da membrana do espermatozóide (Watson, 1981). A caseína, por exemplo, liga-se fortemente com íons  $Ca^{++}$ , o que impediria o acúmulo intracelular de quantidades tóxicas de  $Ca^{++}$ , resultantes do dano das membranas (Hochachka, 1986).

O leite contém lactenina, proteína de baixo peso molecular e bactericida para cepas de *Streptococcus spp.*, que provou ser tóxica em sêmen de touro Almquist (1959). O preparo do diluente leite desnatado para utilização em sêmen eqüino foi descrito por Voss & Pickett (1976) e a inativação da lactenina foi feita por aquecimento do leite a +92°C por dez minutos.

Em experimento realizado no Brasil, Meirelles *et al.* (1998) compararam leite desnatado em pó inativado (aquecido a +92°C por 10 min) e não inativado. As amostras foram diluídas e resfriadas a +5°C e as motilidades total e progressiva avaliadas nas 0, 24 e 48h. Não se observaram diferenças significativas nas motilidades progressiva e total entre o leite desnatado inativado e o leite desnatado não inativado. Em posterior teste de fertilidade, não houve diferença significativa na comparação da taxa de prenhez de 96 éguas inseminadas com amostras diluídas em leite desnatado em pó inativado (72%) e não inativado (68%). Estes resultados demonstram que o processo de inativação não é necessário quando se utiliza leite em pó, não concordando com os achados de Householder *et al.* (1981). Provavelmente, no processo de beneficiamento do leite em pó, ocorra a inativação da lactenina (Meirelles *et al.*, 1998)

O leite, como diluente, foi testado em vários trabalhos, como o de Mattos (1995), onde foi relatado não existir diferença significativa de fertilidade entre o sêmen diluído em leite desnatado inativado e preservado a +4°C por 24 h (58,6%) e o sêmen diluído em leite desnatado inativado e utilizado até uma hora após a coleta (75,7%).

Inseminando 58 éguas, Keller *et al.* (2001) verificaram não existir diferença significativa nas taxas de prenhez entre o sêmen diluído em leite desnatado não inativado e utilizado até uma hora após a coleta (71,4%) e o sêmen preservado a +5°C por 24h (83,0%).

Comparando a fertilidade do sêmen, Lagares *et al.* (2000) utilizaram amostras diluídas em leite desnatado não inativado e em leite desnatado-glicose, resfriadas a +5°C e armazenadas por 24 horas, ou utilizadas até uma hora após a coleta. Os índices de prenhez obtidos com leite desnatado na 0h foi de 79% (n=24); com leite desnatado armazenado por 24h a +5°C foi de 62,5% (n=24); com o diluente



leite desnatado-glicose armazenado por 24h a +5°C foi de 57% (n=21), demonstrando não haver diferença significativa entre os diluentes.

Avaliando a preservação da motilidade de espermatozóides eqüinos armazenados a +4°C com leite desnatado esterilizado (UHT) como diluente, Meirelles *et al.* (1998) utilizaram duas amostras comerciais diferentes (A e B). Os autores observaram que o leite UHT permite manter a motilidade espermática do sêmen resfriado. No entanto, verificaram que, a partir das 24h, o sêmen diluído com o leite beneficiado pelo sistema UHT da marca A apresentou perda mais acentuada e significativa na motilidade total e progressiva quando comparado com o da marca B. Observaram, também, uma grande variabilidade entre as diferentes partidas de leite UHT, não permitindo que os resultados se mantivessem constantes.

## 2.7 RESFRIAMENTO DO SÊMEN

A taxa de resfriamento tem fundamental importância na preservação espermática, sendo que taxas de resfriamento menores minimizam o choque térmico (Amann & Grahan, 1992).

Curvas apropriadas de resfriamento podem permitir o armazenamento de espermatozóides por um longo período (Mattos, 1995; Meireles *et al.*, 1998; Lagares *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2001). Quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, mais lenta deve ser a taxa de resfriamento, pois esta determina a sobrevida espermática (Pickett, 1992). No entanto, curvas rápidas de resfriamento podem causar danos irreversíveis aos espermatozóides (Watson, 1981). Douglas – Hamilton *et al.* (1984) concluíram que o resfriamento rápido (>1°C/min) produziu efeitos deletérios sobre a motilidade e integridade espermáticas, em relação ao resfriamento lento (0,3°C/min).

Comparando o efeito de três curvas de resfriamento até +4°C, com velocidades iniciais médias de 0,3°C, 0,9°C, e 1,3°C/min sobre a motilidade progressiva total e a velocidade espermática do sêmen eqüino diluído em leite

desnatado-glicose, Varner *et al.* (1988) observaram resultados significativamente melhores ( $p < 0,05$ ) na curva mais lenta, dentre as três observadas.

Province *et al.* (1985) testaram o resfriamento do sêmen eqüino de  $+37^{\circ}\text{C}$  a  $+5^{\circ}\text{C}$ , com uma taxa linear de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e verificaram que a motilidade progressiva foi semelhante à das amostras resfriadas a  $0,5$  ou  $0,21^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Keyser *et al.* (1992), através de um resfriador ativo programável construído para o experimento, observaram os efeitos de taxas lineares de resfriamento  $0,1$ ,  $0,05$  e  $0,012^{\circ}\text{C}/\text{min}$  sobre a manutenção da motilidade. Concluíram que o sêmen eqüino pode ser resfriado rapidamente de  $+37^{\circ}\text{C}$  até  $+20^{\circ}\text{C}$ , mas, a partir deste ponto a velocidade de resfriamento deve ser menor que  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , sendo  $0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a ideal.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE SÊMEN

As coletas de sêmen foram realizadas utilizando vagina artificial modelo Hannover (Götze, 1949). Além do tubo interno de borracha, foi utilizado um segundo tubo interno de plástico descartável, lubrificado com vaselina estéril e copo coletor plástico esterilizado (Mattos, 1995). A temperatura interna da vagina artificial ficava entre +42°C e +45°C. Para a realização das coletas, utilizou-se uma égua em cio e devidamente contida com peias e com a cauda protegida. No momento da monta, o pênis ereto foi desviado em direção da vagina artificial. A ejaculação era detectada pelos jatos ejaculatórios, verificados com a palma da mão colocada na porção ventral do pênis. Estes procedimentos foram descritos por Klug (1982).

#### 3.2 EXAME DO SÊMEN

##### 3.2.1 Exame macroscópico do sêmen

Inicialmente, procedeu-se à avaliação e registro do aspecto do ejaculado. Este foi avaliado de acordo com sua consistência (aquoso, soroso, leitoso e cremoso) e coloração (branco-acinzentado e branco-citrino).

A seguir, foi feita a separação da fração gel, quando existente, com uma pipeta de Pasteur e a filtragem da porção rica do sêmen através de uma gaze estéril. O volume do ejaculado foi determinado em proveta estéril.

##### 3.2.2 Motilidade espermática

A motilidade progressiva e a motilidade total dos espermatozoides foi registrada logo após a filtragem do sêmen. Uma gota de sêmen de aproximadamente 20µl foi colocada entre lâmina e lamínula, ambas pré-aquecidas a +37°C sobre mesa

térmica. A amostra foi observada em microscópio de contraste de fase, utilizando-se aumento de 250x. A avaliação de cada característica foi realizada de forma subjetiva, conforme definição de Kenney *et al.* (1983), pelo mesmo observador.

A motilidade progressiva foi avaliada pela porcentagem de espermatozóides que se movimentavam ativamente para a frente e em círculos amplos. Considerou-se como motilidade total a porcentagem de espermatozóides que apresentavam movimento.

Para reduzir os erros de observação, duas lâminas no mínimo, foram realizadas por amostra, sendo observados no mínimo 5 campos em cada. Antes de cada exame, as amostras preservadas a +5°C, eram homogeneizadas pela inversão repetida dos tubos. As lâminas, já preparadas, eram mantidas por 5 minutos sobre mesa térmica a +37°C antes de serem avaliadas.

### 3.2.3 Determinação da concentração espermática

Uma alíquota de 0,05 ml de sêmen sem gel foi diluída em 9,95 ml de solução formol-salina para determinação da concentração espermática por meio de contagem em câmara hematómica (Neubauer). As duas áreas da câmara (superior e inferior) foram preenchidas com sêmen diluído. Cinco quadrados de cada uma das duas áreas foram avaliadas. A soma dos espermatozóides contados nos 10 quadrados foi multiplicada por  $5 \times 10^6$  para se obter a concentração espermática por ml, segundo protocolo adaptado de Krause (1996). O número total de espermatozóides do ejaculado foi obtido através da multiplicação da concentração espermática encontrada pelo volume da amostra.

### 3.2.4 Teste de integridade de membrana – CFDA/PI

Esta técnica foi realizada colocando-se 960 µl de sêmen, 10 µl de iodeto de propídio (PI), 20 µl de carboxifluoresceína (CFDA) e 20 µl de formol-citrato dentro de um pequeno frasco previamente enrolado em papel alumínio, para evitar o contato com a luz. A solução de formol-citrato foi colocada por último, para que ocorresse a

imobilização dos espermatozóides após o contato com o corante. As amostras foram colocadas em banho-maria a  $+37^{\circ}\text{C}$  por 8 minutos. Após este período, foi colocada uma gota entre lâmina e lamínula, analisada em microscópio de fluorescência, em aumento de 1000x, utilizando óleo de imersão. Foi avaliado um total de 100 espermatozóides por amostra, sendo considerados com a membrana íntegra aqueles que se coraram de verde. Foram considerados espermatozóides com a membrana do acrossoma danificada aqueles que apresentaram a região acrossomal corada de vermelho, enquanto o restante da célula apresentava cor verde. As células totalmente coradas de vermelho, foram consideradas com a membrana danificada (Lagares, 1995).

### 3.2.5 Teste de funcionalidade de membrana - teste hiposmótico

Para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática foi utilizado o teste hiposmótico. Foram utilizados 200 $\mu\text{l}$  de água destilada e 100 $\mu\text{l}$  de sêmen, seguindo a técnica de Lomeo & Giambersio (1991), modificada por Lagares *et al.* (1998), perfazendo uma osmolalidade de 100 mOsmol/kg. Este teste foi aplicado às amostras de sêmen em todos os tempos de observação. As amostras foram colocadas em banho-maria a  $+37^{\circ}\text{C}$  por 8 minutos, para posterior análise em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x. Uma gota de cada amostra era colocada entre lâmina e lamínula, sendo observados 100 espermatozóides. Foram considerados espermatozóides com a membrana funcional aqueles que aumentaram de volume, apresentando enrolamento de cauda.

## 3.3 DILUENTES

Foram testados dois diferentes diluentes à base de leite, leite desnatado UHT e um diluente comercial contendo leite desnatado-glicose.

### 3.3.1 Leite UHT

O diluente leite desnatado UHT<sup>1</sup> foi submetido à medição de pH, utilizando-se aparelho específico e bem equilibrado. Quando o pH não se encontrava entre 6,7 e 7,2 este foi ajustado, utilizando uma solução de bicarbonato de sódio a 7,5%. Após a medição do pH, era realizada a medição da osmolalidade do diluente que devia se encontrar entre 250 e 280 mOsmol/kg.

Após medir o pH e a osmolalidade, o diluente foi dividido em frascos esterilizados de 25 ml e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2 Leite-glicose

O diluente leite desnatado-glicose foi o diluente comercial para equinos Equimix<sup>2</sup>. Este é composto de duas partes, um pó contendo glicose, bicarbonato e leite desnatado, e água destilada. Para sua utilização basta diluir o pó com a água. Após a diluição, foi medido o pH (7,35) e a osmolalidade (320 mOsmol/kg) do diluente.

Este diluente foi fracionado em partes proporcionais para cada coleta, em frascos esterilizados, e posteriormente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o dia de sua utilização.

## 3.4 RESFRIAMENTO DO SÊMEN

As amostras de sêmen diluídas foram resfriadas em estufa a  $+4^{\circ}\text{C}$  utilizando uma velocidade de resfriamento de  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre  $+20^{\circ}\text{C}$  e  $+8^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram acondicionadas em tubos plásticos, de 15 ml previamente esterilizados, e

---

<sup>1</sup> Leite UHT Elegê –Elegê Alimentos Brasil

<sup>2</sup> Equimix - Nutricell

permaneceram resfriados por 72 horas. Cada frasco continha um volume de aproximadamente 12 ml.

### 3.5 TÉCNICA DA ELETROFORESE

Após a coleta e o exame, uma alíquota de 2,0 ml de sêmen foi centrifugada a 1500g por 15 a 20 minutos, para obtenção do plasma seminal. O mesmo foi acondicionado em tubos de plástico com rosca e congelado em botijão de nitrogênio líquido para posterior análise laboratorial. As amostras foram descongeladas, recentrifugadas a 10.000 g por 60 minutos à +4<sup>0</sup>C, o sobrenadante foi acondicionado em frascos criogênicos em alíquotas de 50µl, mantidas a -196<sup>0</sup>C, até sua utilização.

Para análise das proteínas, foram coletadas duas amostras de cada reprodutor, com intervalo de 2 meses. Foram efetuadas, pelo menos, duas replicações por amostra, nos géis para eletroforese.

#### 3.5.1 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando como padrão albumina sérica bovina (1mg/ml).

#### 3.5.2 Eletroforese bidimensional

A técnica de eletroforese bidimensional foi realizada pelo método de O'Farrel *et al.*, (1977), modificado por Rodnigh *et al* (1988), a qual é constituída de duas etapas de separação protéica.

##### 3.5.2.1 Primeira dimensão

A primeira dimensão constou de focalização isoelétrica não equilibrada em gel tubular de poliacrilamida a 3,5% (Lenz *et al.*, 1997), com gradiente de pH. Os componentes do gel utilizado na primeira dimensão são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do gel de primeira dimensão

Reagentes	Concentração
Acrilamida/bis-acrilamida (29:1)	3,5%
Uréia	9,2 M
Anfolina pH 2-4	0,5%
Anfolina pH 3,5-10	4,0%
Anfolina pH 5-7	0,5%
Igepal	2,0%
TEMED	0,2%

O gradiente de pH foi obtido através de polímeros com um pKa definido, denominados anfolinas. Foi utilizado um gradiente de 2 a  $10^3$ .

A mistura para preparação dos géis de primeira dimensão permaneceu estocada em alíquotas de 0,4 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No momento da utilização, a mistura foi descongelada e, para que ocorresse a polimerização, foram adicionados 2  $\mu\text{l}$  de persulfato de amônio 10%, como agente catalisador.

Capilares de vidro com 15 cm de comprimento e 1,0 mm de diâmetro interno foram preenchidos com a mistura para preparação dos géis, logo após a adição do persulfato de amônio, com auxílio de cânulas de silicone, até 3-4 cm da extremidade superior.

Após a polimerização dos géis (2-3 horas), os capilares foram montados na cuba de primeira dimensão, onde 16 amostras poderiam ser submetidas simultaneamente à separação eletroforética (Figura 1).

Foi aplicada uma quantidade de 60  $\mu\text{g}$  de proteína em cada tubo, e foi usado como marcador de frente de corrida o citocromo C. A fonte utilizada foi EPS 3501<sup>4</sup> com voltagem máxima de 800V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por gel. O tempo de corrida foi de aproximadamente 90 minutos. A corrida foi interrompida quando a banda de citocromo C (visível) atingiu aproximadamente 7,5 cm de migração. Os tubos capilares foram então retirados da cuba, identificados e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da transferência para a segunda dimensão. O tampão superior utilizado foi  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 mM (anólito), e o tampão inferior utilizado foi NaOH 20 mM (católito).

A Figura 1 mostra a cuba de primeira dimensão com os capilares de vidro.

<sup>3</sup> Amershan Pharmacia Biotech do Brasil Ltda.

<sup>4</sup> Amershan Pharmacia Biotech do Brasil Ltda



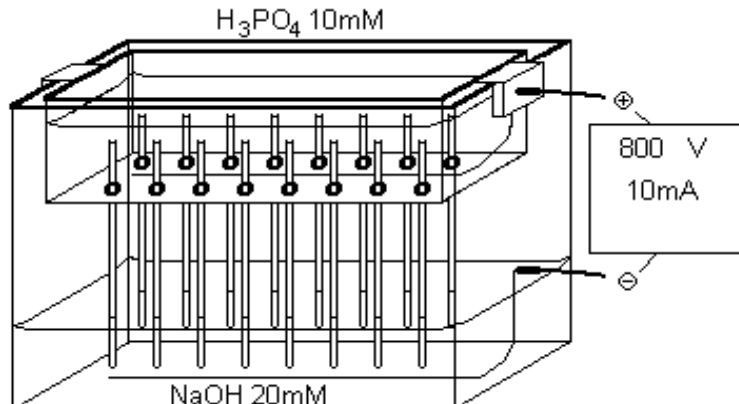


Figura 1. Representação esquemática da primeira dimensão

### 3.5.2.2 Segunda dimensão

A segunda dimensão consta de eletroforese em placas de gel (*SDS-PAGE*), com sistema de tampão descontínuo, que separa as proteínas pelo seu peso molecular. Para separação das proteínas foi utilizado gel de separação com uma concentração de 12% de acrilamida. Foi utilizado, como padrão, 17-0518-01<sup>5</sup>, o qual marca pesos moleculares entre 14,4 e 97 kDa .

Os géis utilizados na segunda dimensão (*SDS-PAGE*) foram preparados em conjuntos de 8. Os componentes do gel de separação, bem como do gel de entrada, são mostrados na Tabela 2.

Os géis de segunda dimensão foram confeccionados entre duas placas de vidro (16 cm x 14 cm), separadas por espaçadores (1mm de espessura). Para maior uniformização na composição dos géis, foi montado um conjunto de oito pares de placas em uma caixa de acrílico. Cada par era composto de uma placa inteira e outra com bisel. O espaço entre as placas, deixado pelos espaçadores, foi preenchido com gel de separação, cujos componentes são descritos na Tabela 2, até a altura de 2,5 cm da borda superior da placa com bisel. Após a polimerização (1:30-2 horas) do gel de separação, foi colocado, sobre o mesmo, o gel de entrada (Tabela 2).

<sup>5</sup> Amershan Pharmacia Biotech do Brasil Ltda.

Tabela 2. Componentes do gel de segunda dimensão (*SDS-PAGE*)

Reagentes	Separação 12%	Entrada
Acrilamida/bisacrilamida (39:1)	12%	4%
Tampão Tris-HCl	1,5 M pH8,8	0,5 M pH6,8
SDS	0,1%	0,1%
Glicerol	7,46%	-
TEMED	0,06%	0,05%
Persulfato de amônio	0,045%	0,098%

% expressa em v/v

Após a polimerização dos géis, a caixa acrílica foi desmontada e o conjunto de placas contendo os géis foi guardado sob refrigeração envolto em plástico. No momento da utilização, elas foram fixadas nas cubas de acrílico de segunda dimensão.

Os géis de primeira dimensão foram descongelados e rapidamente expulsos dos capilares, com auxílio de uma seringa, para o tampão de equilíbrio (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1% e azul de bromofenol). Os géis permaneceram nesta solução (4ml/gel) por 15 minutos, sob agitação, para então serem transferidos para os géis *SDS-PAGE*. Esta etapa é necessária para que as proteínas presentes nos géis de primeira dimensão combinem-se com o *SDS* e, assim, possam ser separadas na segunda dimensão.

Cada placa *SDS-PAGE* recebeu dois géis de primeira dimensão, dispostos horizontalmente sobre o gel de entrada da segunda dimensão e com as extremidades ácidas voltadas para o centro da placa. Posteriormente, os géis de primeira dimensão foram fixados com agarose 0,5% contendo 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 2).

A parte superior da cuba foi preenchida com tampão superior (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8,8) e a inferior com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Foi utilizada a fonte EPS 301<sup>6</sup>, com voltagem máxima de 125V, corrente de 20mA/placa e a corrida teve uma duração aproximada de 6:30 - 7 horas, utilizando como frente de corrida o azul de bromofenol.

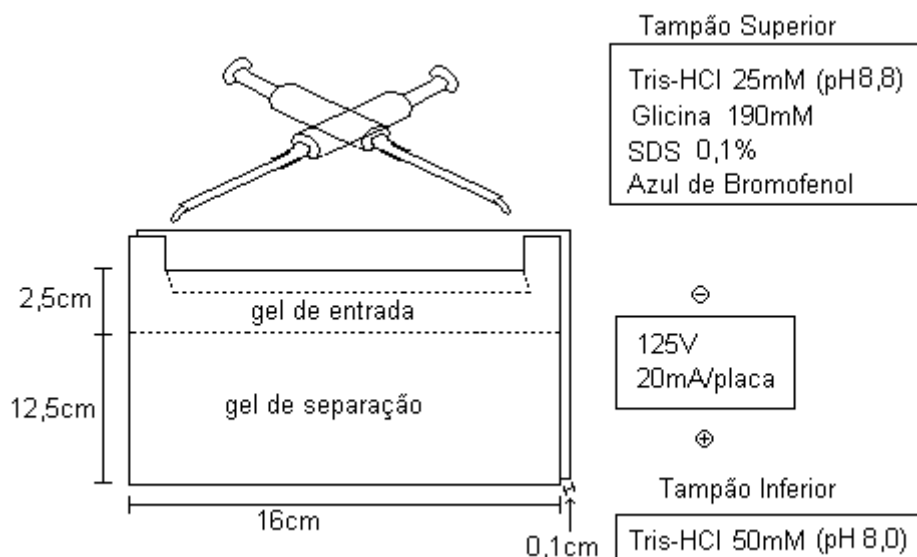


Figura 2. Representação esquemática da segunda dimensão

Os géis foram corados com solução de *Comassie Brilliant Blue 250-R* (*Comassie Blue* 0,15%, metanol 53% e ácido acético 7% em água bidestilada) por aproximadamente 18 horas.

A descoloração dos géis para evidenciação das bandas foi efetuada em solução de metanol 50% e ácido acético 7% em água bidestilada, por cerca de 3 horas, sob agitação e, a seguir, os géis foram imersos numa solução de secagem (metanol 50% e glicerol 1% em água bidestilada).

Após duas horas na solução de secagem, os géis foram montados entre dois papéis de celofane sobre uma placa de vidro e mantidos à temperatura ambiente por 3 dias.

### 3.5.3 Quantificação das bandas protéicas

Os géis foram escaneados<sup>7</sup> e analisados pelo programa Optiquant Acquisition &

<sup>6</sup> Amershan Pharmacia Biotech do Brasil Ltda.

Analysis<sup>8</sup>, para determinação da densidade óptica das bandas protéicas, as quais foram expressas em pixels.

A densidade óptica das bandas protéicas foi expressa em percentagem relativa, sendo que 100% representou o total de bandas protéicas (pixels) de uma área definida, constante para todos os géis, cada banda protéica correspondendo a uma percentagem do total.

Através do peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, foi verificada a correspondência das bandas protéicas analisadas a proteínas específicas já identificadas no plasma seminal bovino.

---

<sup>7</sup> Hewlet-Packard Scanjet 6100 C

<sup>8</sup> versão 02.00, Packard Instrument Company

## 4 EXPERIMENTOS

4.1 EXPERIMENTO 1 – Influência de diferentes concentrações de plasma seminal e de dois diluentes na motilidade e na integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozóides eqüinos resfriados.

### 4.1.1 Animais

Foram utilizados 4 garanhões, da raça Puro Sangue de Corrida comprovadamente férteis e em atividade sexual, com idades variando entre 5 e 16 anos. Os animais estavam alojados na Faculdade de Veterinária da UFRGS ou em criatórios do município de Porto Alegre. Eram mantidos soltos em piquetes durante o dia e estabulados à noite. A alimentação era à base de aveia e ração comercial mais feno de alfafa.

### 4.1.2 Diluentes

Foram utilizados como diluentes o leite UHT (3.3.1) e leite-glicose (3.3.2).

### 4.1.3 Delineamento experimental

Foram realizadas 5 coletas de sêmen de cada garanhão, perfazendo um total de 20 coletas. Imediatamente após a coleta, através de vagina artificial (3.1), o sêmen foi avaliado quanto à motilidade (3.2.2) e concentração (3.2.3), e diluído 1:2 com EDTA-glicose<sup>9</sup>, dividido em oito alíquotas e centrifugado a 600g, por 10 minutos, para remoção do plasma seminal. O *pellet* de cada alíquota foi ressuspendido com uma determinada quantidade do plasma seminal, diluído em EDTA-glicose do sobrenadante, acrescido de um determinado volume de um dos dois diluentes até atingir uma concentração final entre 40 e 50x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, contendo as seguintes concentrações finais de plasma seminal: 0%, 2,5%, 5% e 10%. Desta forma, constituíram-se os seguintes grupos de tratamento:

**UHT 0%** – Leite UHT desnatado, sem plasma seminal

**UHT 2,5%** - Leite UHT desnatado, com 2,5% de plasma seminal

---

<sup>9</sup> Merck 1- Minitüb Abfull- und Labortechnik GmbH & CO- Kg Germany

**UHT 5%** – Leite UHT desnatado, com 5% de plasma seminal

**UHT 10%** – Leite UHT desnatado, com 10% de plasma seminal

**LG 0%** – Leite-glicose sem adição de plasma seminal

**LG 2,5%** – Leite-glicose com 2,5% de plasma seminal

**LG 5%** – Leite-glicose com 5% de plasma seminal

**LG 10%** – Leite-glicose com 10 % de plasma seminal

Imediatamente após a diluição, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva e total (3.2.2) e funcionalidade (3.2.4) e integridade (3.2.3) da membrana plasmática. A seguir, os oito frascos contendo o sêmen, com um volume aproximado de 12 ml, foram resfriados em incubadora a +4°C a uma taxa de resfriamento de 0,3° C/mim (Brinsko *et al.*, 1999), sendo o sêmen novamente avaliado às 24, 48 e 72 horas.

#### 4.1.4 Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância. Para serem analisados por este procedimento, os dados percentuais foram transformados em ângulos correspondentes ao arco-seno da raiz quadrada da proporção. Foi adotado o modelo de parcelas subdivididas, com tratamentos (diluentes) nas parcelas principais, arranjos em blocos casuais (coletas) e com os tempos nas sub-parcelas. Como teste complementar para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey.

#### 4.1.5 Resultados

Não foram encontradas interações entre as concentrações de plasma seminal e o diluente utilizado na preservação de sêmen a +4°C, a motilidade total ( $p=0,1042$ ), a motilidade progressiva ( $p=0,4561$ ), o teste de funcionalidade de membrana ( $p=0,4324$ ), o teste de integridade de membrana ( $p=0,2324$ ) e as alterações de acrossoma ( $p=0,8038$ ). Portanto, a influência da concentração de plasma seminal e dos diluentes, sobre os diferentes parâmetros espermáticos, serão analisados separadamente.

Na Tabela 3 estão expressos os valores médios de motilidade total de amostras de sêmen resfriado, contendo diferentes concentrações de plasma seminal no diluente, nos diferentes tempos de observação.

Tabela 3- Valores médios de motilidade total às 0h, 24h, 48h e 72 h de amostras de sêmen resfriado contendo 0%, 2,5%, 5% e 10% de plasma no diluente

Concentração de plasma seminal no diluente	Motilidade total (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0	74 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>
2,5%	75 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>
5%	74 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>	37 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>
10%	74 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	37 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>

(a,a  $p=0,2921$ ) letras iguais na coluna não expressam diferença significativa

Ao se analisar a Tabela 3, verifica-se que as diferentes concentrações de plasma seminal utilizadas não influenciaram significativamente ( $p=0,2921$ ) a motilidade total nos diferentes tempos avaliados. Não foi observada interação entre concentração de plasma e tempo de armazenamento ( $p=0,9410$ ).

Na Tabela 4 estão expressos os valores médios de motilidade progressiva de amostras de sêmen resfriado, contendo diferentes concentrações de plasma seminal no diluente, nos diferentes tempos de observação

Tabela 4- Valores médios de motilidade progressiva de sêmen equino resfriado nas 0h, 24h, 48h e 72h contendo 0%, 2,5%, 5% e 10 % de plasma seminal

Concentração de plasma seminal	Motilidade Progressiva (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0	46 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
2,5%	47 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
5%	48 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>
10%	47 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>

(a,a; p=0,7441) letras iguais na coluna não expressam diferença significativa

Não foram verificadas diferenças significativas (p=0,7441) na motilidade progressiva das amostras de sêmen contendo diferentes concentrações de plasma seminal nos diferentes tempos de avaliação (Tabela 4). Foi verificada uma queda constante da motilidade progressiva nos diferentes tempos de avaliação, porém, não se observou interação entre concentração de plasma e tempo de armazenamento (p=0,3252).

Na Tabela 5, estão expressos os valores médios de espermatozóides com membrana funcional, de sêmen equino resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação ( 0h, 24h, 48h e 72h), diluídos em diferentes concentrações de plasma seminal, (0%, 2,5%, 5% e 10%).



Tabela 5- Valores médios de espermatozóides, diluídos e resfriados, com membrana funcional às 0h, 24h, 48h e 72h de observação, contendo diferentes concentrações de plasma seminal.

Concentração de plasma seminal	Espermatozóides com a membrana funcional (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0 %	47 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>
2,5 %	48 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>
5 %	47 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>
10 %	48 <sup>a</sup>	37 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>

( a, a; p=0,2876) letras iguais na coluna não expressam diferença significativa

Observa-se, ao analisar a Tabela 5, que as diferentes concentrações de plasma seminal não influenciaram significativamente (p=0,2876) a funcionalidade de membrana dos espermatozóides resfriados nos diferentes tempos de avaliação. Verificou-se uma diminuição da capacidade funcional da membrana com o aumento do tempo de armazenagem. No entanto, não foi constatada interação entre concentração de plasma e tempo de armazenamento (p=0,9916).

Na Tabela 6, estão expressos os valores médios de espermatozóides com membrana íntegra, nos diferentes tempos de observação (0h, 24h, 48h e 72h), de amostras de sêmen resfriado com diferentes concentrações de plasma seminal.

Tabela 6 – Valores médios de espermatozóides eqüinos com a membrana íntegra às 0h, 24h, 48h e 72h com 0%, 2,5%, 5% e 10% de plasma seminal

Concentração de plasma seminal	Espermatozóides com a membrana íntegra (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0 %	62 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>
2,5 %	66 <sup>b</sup>	58 <sup>b</sup>	50 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>
5 %	63 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>
10 %	63 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	46 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>

(a,b;  $p < 0,05$ )- letras diferentes na coluna representam diferença significativa

Ao se analisar a Tabela 6, verifica-se que os espermatozóides eqüinos diluídos e contendo uma concentração de 2,5% de plasma seminal apresentaram maior número de células com membrana íntegra que as demais concentrações às 0h e 24h de armazenamento. No entanto, a partir das 48h e nas 72h os melhores resultados foram encontrados nas concentrações de 0%, 2,5% e 5%. Observou-se um significativo ( $p=0,0001$ ) aumento dos danos de membrana com o transcorrer do armazenamento. Não foi verificada interação entre as concentrações de plasma utilizadas e o tempo de armazenamento ( $p=0,2840$ ).

Na Tabela 7 estão expressos os valores médios de espermatozóides eqüinos, preservados a  $+4^{\circ}\text{C}$  com diferentes concentrações de plasma seminal, apresentando defeitos de acrossoma nos diferentes tempos de observação (0h, 24h, 48h e 72 h).

Tabela 7- Valores médios de espermatozoides com lesão de acrossoma às 0h, 24h, 48h e 72 h de amostras contendo diferentes concentrações de plasma seminal

Concentração de plasma seminal	Espermatozoides com defeito de acrossoma (%)			
	0h	24h	48h	72h
0 %	13 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	19 <sup>ab</sup>	22 <sup>a</sup>
2,5%	10 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	23 <sup>a</sup>
5%	11 <sup>ab</sup>	16 <sup>ab</sup>	19 <sup>ab</sup>	22 <sup>a</sup>
10%	13 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>

(a,b p<0,05 ) letras diferentes representam diferença significativa

Ao analisar a Tabela 7, verifica-se que as amostras de sêmen contendo 2,5% de plasma seminal apresentaram menor dano de acrossoma entre a 0h e as 48h que as amostras contendo 10%. No entanto, as amostras contendo 2,5% de plasma não se diferenciaram das que continham 0% e 5% em todos os tempos avaliados. Observou-se um significativo ( $p=0,0001$ ) aumento dos danos de acrossoma associado ao tempo de armazenamento em todas as amostras. Não foi constatada interação entre concentração de plasma e tempo de estocagem ( $p=0,5468$ ).

Na Tabela 8, estão expressos os resultados de motilidade total de amostras de sêmen equino, diluído em leite UHT e leite-glicose e armazenados a +4°C por 72 horas.

Tabela 8 Valores médios de motilidade total, de sêmen eqüino resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Diluyente	Motilidade total (%)			
	0 h	24 h	48h	72 h
Leite UHT	75 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>
Leite-glicose	73 <sup>a</sup>	53 <sup>b</sup>	31 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>

a,b (p<0,05)-letras diferentes na coluna expressam diferenças significativas

Observou-se interação (p=0,0158) entre os diluentes e o tempo de armazenamento. Avaliando a Tabela 8, verifica-se que na hora 0 as amostras diluídas em leite e leite-glicose não apresentaram diferença significativa (p=0,359). No entanto, observou-se motilidade total significativamente superior dos espermatozóides das amostras diluídas em leite UHT em relação às diluídas em leite-glicose nas 24h (p=0,0579), nas 48h (p=0,0001) e nas 72h (p=0,0006).

Na Tabela 9, são apresentados os valores médios da motilidade progressiva de sêmen eqüino diluído, em leite UHT e leite-glicose, resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação.

Tabela 9- Valores médios de motilidade progressiva, de sêmen eqüino resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Diluyente	Motilidade Progressiva (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Leite UHT	48 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
Leite glicose	45 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>

(a,b) letras diferem nas colunas representam diferenças significativas (p<0,05)

Ao se analisar a Tabela 9, observa-se que o sêmen eqüino diluído em leite UHT apresentou motilidade progressiva significativamente superior ( $p < 0,05$ ) em relação ao diluente leite-glicose nas 0h, 24h, 48h e 72 h. Não se observou interação entre tempo de armazenamento e diluente utilizado ( $p = 0,2306$ )

Na Tabela 10, estão expressos os valores médios de espermatozóides de sêmen eqüino, resfriado a  $+4^{\circ}\text{C}$ , com a membrana funcional nos diferentes tempos de observação (0h, 24h, 48h e 72 h) e nos diferentes diluentes.

Tabela 10 – Valores médios de espermatozóides com membrana funcional, de sêmen eqüino resfriado a  $+4^{\circ}\text{C}$ , nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Diluyente	Espermatozóides com membrana funcional (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Leite UHT	54 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>
Leite-glicose	40 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	24 <sup>b</sup>

a,b; ( $p < 0,05$ ) letras diferentes na coluna representam diferença significativa

Foi observada interação ( $p = 0,0001$ ) entre tempo de armazenamento e diluente utilizado. No entanto, ao se analisar a Tabela 10, verifica-se que os espermatozóides eqüinos diluídos em leite UHT apresentaram maior número de células com a membrana funcional que o diluente leite-glicose em todos os momentos de observação (0h  $p = 0,0001$ ; 24h  $p = 0,0001$ ; 48h  $p = 0,0081$ ; 72h  $p = 0,0042$ )

Na Tabela 11, estão expressos os valores médios de espermatozóides eqüinos com a membrana íntegra, às 0h, 24h, 48h e 72h de observação, com os dois diferentes diluentes.

Tabela 11 –Valores médios de espermatozóides com membrana íntegra de sêmen eqüino, resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Diluyente	Espermatozóides com membrana íntegra (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Leite UHT	64 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>
Leite-glicose	63 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>

(a,b) (p<0,05) letras diferentes na coluna representam diferenças significativas

Foi observada interação entre tempo e o diluyente utilizado (p=0,0064). Avaliando-se a Tabela 11, pode-se verificar que, somente após 72 h de armazenamento, o número de espermatozóides com a membrana íntegra foi significativamente (p<0,0006) superior, nas amostras diluídas com Leite-glicose do que nas armazenadas com Leite UHT.

Na Tabela 12, estão apresentados os valores médios de espermatozóides eqüinos, armazenados a +4°C, com acrossoma danificado nas diferentes horas de observação (0h, 24h, 48h e 72h), nos dois diluentes utilizados.

Tabela 12 –Valores médios de espermatozóides com acrossoma danificado de sêmen eqüino, resfriado a +4°C, nos diferentes diluentes às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Diluyente	Espermatozóides com acrossoma danificado (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Leite UHT	12 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
Leite-glicose	12 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>

(a,a) (p>0,05) letras iguais na coluna não representam diferença significativa

Ao se analisar a Tabela 12, nota-se não existir diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em nenhum tempo de observação, quanto a lesão de acrossoma, em nenhum dos dois diluentes. Não foi observada interação entre tempo e diluente utilizado ( $p = 0,4321$ ).

#### 4.1.6 Discussão

A motilidade total e progressiva foi preservada, no presente trabalho, por até 72h. Uma comparação pode ser realizada com os resultados obtidos pelos trabalhos de Mattos (1995), Keller *et al.* (2001) e Vieira *et al.* (2002) que obtiveram motilidades similares. No entanto, não se obtiveram resultados como os de Varner *et al.* (1988) e os de Van der Holst (1984), que relatam a manutenção da viabilidade espermática por até 120h. Mesmo utilizando taxas elevadas de resfriamento ( $1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), Varner *et al.* (1988) obtiveram 8% de motilidade progressiva e 12% de total após 120h a  $+5^{\circ}\text{C}$ . Características espermáticas individuais dos ganhões utilizados nesse trabalho, como alta sobrevivência, resistência ao choque térmico e adaptação dos espermatozoides ao diluente, podem ter colaborado para a obtenção destes resultados. O fato de terem sido utilizados apenas 2 ganhões, em contraste com os 4 utilizados neste experimento, os 8 por Mattos (1995), os 6 por Keller *et al.* (2001) e os 6 por Vieira *et al.* (2002) reforça esta possibilidade. O aumento do número de indivíduos utilizados resulta numa amostragem mais fiel da população, onde ganhões com sobrevivência espermática inferior contribuíram para a obtenção de períodos menores de manutenção da motilidade.

Outro fator importante na manutenção espermática, verificado no presente experimento, foi a utilização de uma concentração que maximiza a sobrevivência espermática *in vitro* (Varner *et al.*, 1987). Utilizou-se uma concentração final de 40 a  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml, obtendo-se padrões de motilidade semelhantes aos referidos por Palmer (1984), Mattos (1995), Keller (1998), Meirelles *et al.* (1999) e Lagares *et al.* (2000).

Os resultados de integridade e funcionalidade de membrana foram semelhantes aos obtidos por Vieira *et al.* (2002), que utilizou diluente e curva de resfriamento semelhantes ao do presente experimento.

As diferentes concentrações de plasma seminal utilizadas (0%, 2,5%, 5% e 10%) não influenciaram a motilidade progressiva e total, bem como, a funcionalidade de membrana dos espermatozóides. Observou-se, no entanto, que a integridade de membrana de células espermáticas foi afetada, nas amostras que continham 10% de plasma seminal, a partir das 48h de armazenamento a +4°C. Da mesma forma amostras com 0% e 10% de plasma seminal tiveram maior número de acrossomas danificados a partir da diluição.

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatados por Keller *et al.* (2001) que observaram melhores resultados de motilidade total e progressiva nas amostras contendo 1,95% de plasma seminal, quando comparado com amostras contendo 17,78%. No entanto, não coincidem com os achados por Jasko *et al.* (1992), que obtiveram piores resultados de motilidade progressiva nas alíquotas de sêmen que continham 0% de plasma seminal, em comparação com as que apresentavam 5%, 10% e 20%. Nesse trabalho, os autores utilizaram um *pool* de plasma seminal obtido de quatro garanhões que foi congelado a -20°C. Entretanto, esta temperatura de congelamento desidrata as proteínas do plasma e conseqüentemente prejudica os efeitos causados pela sua utilização.

Observa-se que após 48h de armazenamento, são detectadas alterações de integridade de membrana plasmática nas amostras que continham 10% de plasma seminal, o que demonstra efeito deletério do mesmo. Entretanto, estas alterações não são observadas na funcionalidade de membrana. Provavelmente, a coloração com CFDA/PI detecte lesões que não influenciam negativamente a motilidade e a funcionalidade de membrana. Da mesma forma, observaram-se maior número de espermatozóides com acrossoma alterado, no exame de fluorescência, nas amostras contendo 0 e 10%. Estas alterações, também, não influenciaram a motilidade e funcionalidade da membrana dos espermatozóides, mas podem atuar como fatores limitantes na capacidade de fertilização dos espermatozóides.

Provavelmente concentrações acima de 10% de plasma provoquem, também, danos à motilidade e à funcionalidade de membrana dos espermatozóides, concentrações estas não testadas no presente experimento.



Os diluentes utilizados diferiram significativamente quanto à motilidade total, às 24h, 48h e 72h, quanto à motilidade progressiva e funcionalidade de membrana, durante todo o tempo de armazenamento, e quanto à integridade de membrana plasmática dos espermatozóide, às 72h de armazenamento. Não se observaram diferenças quanto à integridade de acrossoma.

Com a utilização de leite UHT desnatado obtiveram-se os melhores resultados de motilidade espermática progressiva e total quando comparados com o diluente comercial leite-glicose. Estes resultados não coincidem com os observados por Mattos (1995) e Lagares *et al.* (2000), com sêmen preservado a +4°C, que não encontraram diferenças na motilidade entre amostras diluídas com leite-desnatado e leite desnatado-glicose. Entretanto, os autores utilizaram leite desnatado em pó para a confecção de ambos os diluentes. Da mesma forma, os resultados obtidos não coincidem com os observados por Province *et al.* (1985), que verificaram, ao armazenar a +15°C e a +20°C, que o sêmen diluído em leite desnatado-glicose apresentava resultados superiores de motilidade que os diluídos em leite desnatado.

O sêmen preservado em leite UHT desnatado apresentou os melhores resultados de funcionalidade de membrana, em relação ao leite desnatado-glicose, durante todo o tempo de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com os observados por Lagares *et al.* (2000). O percentual de espermatozóides com membrana íntegra foi superior nas amostras diluídas em leite desnatado UHT do que nas diluídas em leite-glicose, nas 72h de armazenamento. Estes resultados, também, coincidem com os obtidos por Lagares *et al.* (2000).

As diferenças encontradas de motilidade, funcionalidade e integridade de membrana, poderiam ser explicadas pelas diferentes osmolalidades dos diluentes (leite desnatado UHT – 250 a 280 mOsm/kg e leite-glicose - 320 mOsm/kg) provocadas pela adição da glicose. Meirelles *et al.* (1999) observaram queda de motilidade nas amostras com maior osmolalidade. Tendo em vista, que a osmolalidade do sêmen se encontra entre 280 e 300 mOsm/kg (Weitze & Muller, 1991), observou-se que o espermatozóide equino apresenta motilidade maior quando ressuspenso em meios próximos à

isomolalidade(300mOsmol/Kg). Sieme *et al.*( 1998) e Kapp (1995) também relatam influência negativa de soluções hipertônicas sobre a motilidade espermática em equinos.

Liu *et al.* (1995) sugeriram que, sob condições normais, a água atravessaria a membrana plasmática através de canais protéico. Alterações da membrana que podem ocorrer devido a hipertonidade e, principalmente, dos canais formados pelas proteínas íntegras, afetariam a permeabilidade da membrana. A redução ou perda duma fração de água induziria à alteração da estrutura e da função da membrana do espermatozóide e, conseqüentemente, à perda da capacidade reguladora. Esta fato poderia explicar a redução da motilidade total, no presente trabalho. O aumento excessivo da osmolalidade pode ter provocado perda da fração de água, alterando a estrutura da membrana plasmática e, conseqüentemente, a motilidade.

Espermatozóides humanos quando submetidos a condições hipertônicas entre temperaturas de 22°C e 0°C, apresentaram menores danos do que sob temperaturas mais altas (Gao *et al.*, 1993). No presente trabalho, os danos ocorridos nos espermatozóides à temperatura ambiente (0h) parecem continuar por 72h a +4°C, refletindo-se na redução da motilidade progressiva e na funcionalidade de membrana espermática no meio com a osmolalidade superior. Portanto, a redução da temperatura não diminui os efeitos prejudiciais à motilidade e a funcionalidade de membrana, causados pela mais alta osmolalidade do diluente leite-glicose.

A diminuição da motilidade e da funcionalidade da membrana, assim como, o aumento de membranas plasmáticas alteradas, no sêmen diluído em leite-glicose, poderia estar associado, também, à processos bioquímicos. A adição de substratos metabólicos como a glicose, objetivando agregar uma fonte extra de energia (Brinsko & Varner, 1992) pode ter sido prejudicial aos espermatozóides. A glicose é transportada através da membrana plasmática por proteínas específicas, proporcionando a principal fonte de ATP, para os espermatozóides durante o metabolismo aeróbico. No entanto, uma das conseqüências do metabolismo aeróbico é a produção de peróxido de hidrogênio na mitocôndria, que induz a peroxidação de lipídios na membrana plasmática. Esta peroxidação causa disfunção de enzimas metabólicas, aumenta a

permeabilidade de membrana e é prejudicial à integridade, motilidade e viabilidade espermática (Amann & Graham, 1992).

Conclui-se que concentrações até 5% de plasma seminal não afetam a motilidade, a funcionalidade e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides. A utilização de leite desnatado UHT, proporcionou os melhores resultados de motilidade e integridade e funcionalidade de membrana, em relação ao leite-glicose.

## 4.2 EXPERIMENTO 2 – Perfil protéico do plasma seminal de garanhões de alta fertilidade e de baixa fertilidade

### 4.2.1 Animais

Foram utilizados 4 garanhões, da raça Puro Sangue de Corrida, alojados em centros criatórios da grande Porto Alegre, sendo 2 com boa qualidade de sêmen (com os seguintes parâmetros de sêmen logo após a coleta: motilidade progressiva superior a 45%, motilidade total superior a 70%, alterações morfológicas inferior a 20% e membrana íntegra superior a 60%) e dois com baixa qualidade de sêmen (com os seguintes parâmetros de sêmen logo após a coleta: motilidade progressiva inferior a 30%, motilidade total inferior a 55%, alterações morfológicas superior a 45% e membrana íntegra inferior a 45%, logo após a coleta) (Tabela 13). Os animais tinham entre 8 e 18 anos de idade, eram mantidos durante o dia soltos em piquetes e estabulados durante a noite. A alimentação era à base de aveia, ração comercial e feno de alfafa.

Tabela 13- Parâmetros reprodutivos dos garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen

Parâmetros médios a 0h	Alta qualidade de sêmen	Baixa qualidade de sêmen
Motilidade total (%)	74	54
Motilidade progressiva (%)	48	30
Concentração ( $\times 10^6$ /ml)	240	140
Alterações morfológicas totais (%)	18	47
Espermatozóides com membrana íntegra (%)	61	42

#### 4.2.2 Delineamento Experimental

Após a coleta de sêmen através de vagina artificial (3.1), o sêmen foi centrifugado a 3000g por 20 minutos para retirar o plasma seminal, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 3000g por 20 minutos e posteriormente avaliado ao microscópio para verificar se continha alguma célula espermática.

O plasma seminal de cada um dos garanhões, após duas centrifugações, foi dividido em alíquotas de 1,5 ml e congeladas a  $-196^{\circ}\text{C}$ . No momento da realização da eletroforese bidimensional (3.5), (3.5.1) e (3.5.2), o plasma foi descongelado à temperatura ambiente, novamente centrifugado a 10.000g por 1 hora, e sua proteína mensurada.

Foram coletados dois ejaculados de cada garanhão, com intervalo de 1 mês e realizado o perfil eletroforético do plasma congelado.

#### 4.2.3 Análise estatística

O delineamento foi completamente ao acaso, com um arranjo em parcela subdividida sendo considerado como parcela principal a fertilidade e com sub-parcelas o fator coleta e a interação coleta/fertilidade e como erro A os garanhões dentro da fertilidade. Como variável resposta foram considerados os logaritmos das percentagens relativas da densidade óptica das bandas protéicas.

#### 4.2.4 Resultados

A distribuição das bandas protéicas do plasma seminal equino pode ser observada na Figura 3 e na Tabela 14.

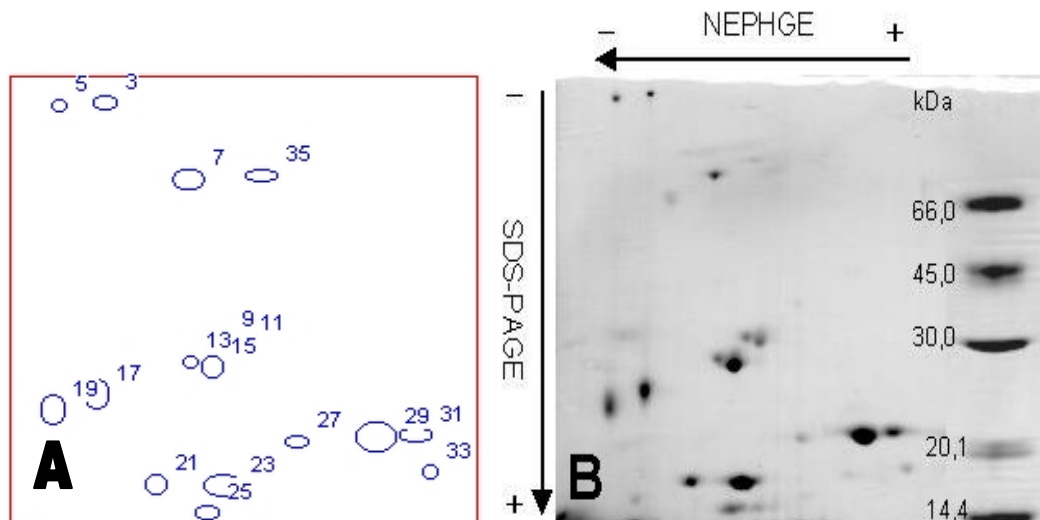


FIGURA 3. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal equino.

Em A: Desenho esquemático das proteínas representadas por círculos com número correspondente. A numeração designa a banda protéica descrita na Tabela 3.

Em B: Gel bidimensional *SDS-PAGE* à 12%, corado com *Comassie Blue*. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (*NEPHGE*) na primeira dimensão. Os marcadores de peso molecular estão à direita e os respectivos pesos, ao lado.

Foram encontradas 17 bandas protéicas (identificadas através de sistema numérico) nas amostras analisadas nos géis de *SDS-PAGE* a 12% (Figura 3).

A Tabela 14 apresenta valores de peso molecular e pontos isoelétricos aproximados, média, desvio-padrão, valores máximos e mínimos da densidade óptica das proteínas do plasma seminal de reprodutores eqüinos de acordo com a qualidade do sêmen. Dez bandas protéicas estavam presentes em todas as amostras dos reprodutores e foram denominadas proteínas **7** (65-70 kDa), **9** (35-40 kDa), **11** (35-40 kDa), **13** (35-40 kDa), **15** (30-35 kDa), **17** (25-30 kDa), **21** (10-15 kDa), **23** (15-20 kDa), **29** (20-25 kDa) e **31** (20-25 kDa). Apenas as bandas protéicas **3**, **5**, **17**, **19** e **31** apresentaram densidade óptica significativamente superior ( $p < 0,05$ ), entre as amostras do plasma seminal dos eqüinos considerados de alta e baixa qualidade de sêmen.

TABELA 14. Peso molecular (PM), ponto isoelétrico (pI) e densidade óptica das proteínas do plasma seminal dos reprodutores eqüinos conforme a fertilidade.

Banda Protéica	Peso Molecular Kda	PI	Qualidade do Sêmen						p=
			Alta			Baixa			
			Média e DP	Max	Min	Média e DP	Max	Min	
3	75-80	8,0-8,2	0,15 ± 0,09	0,27	0,00	0,24 ± 0,08	0,39	0,16	<b>0.04</b>
5	75-80	8,5-8,7	0,09 ± 0,08	0,17	0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	<b>0.01</b>
7	65-70	6,8-7,0	0,50 ± 0,14	0,68	0,34	0,52 ± 0,14	0,70	0,27	0.68
9	40-45	5,8-6,0	0,23 ± 0,11	0,50	0,14	0,18 ± 0,05	0,26	0,13	0.31
11	40-45	5,5-5,7	0,25 ± 0,08	0,40	0,11	0,24 ± 0,05	0,34	0,18	0.81
13	35-40	6,8-7,0	0,26 ± 0,17	0,68	0,13	0,32 ± 0,21	0,79	0,17	0.40
15	30-35	6,5-6,7	0,50 ± 0,12	0,65	0,23	0,51 ± 0,21	0,74	0,23	0.92
17	20-25	8,0-8,2	0,64 ± 0,17	0,88	0,33	1,28 ± 0,74	2,84	0,83	<b>0.01</b>
19	20-25	8,5-8,7	0,42 ± 0,30	0,76	0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00	<b>0.04</b>
21	10-15	6,2-6,4	0,40 ± 0,07	0,51	0,29	0,39 ± 0,18	0,68	0,16	0.09
23	10-15	5,8-6,0	0,92 ± 0,15	1,16	0,68	0,89 ± 0,13	1,06	0,71	0.74
25	10-15	5,6-5,8	0,25 ± 0,11	0,39	0,00	0,19 ± 0,10	0,31	0,00	0.39
27	20-25	4,0-4,2	0,17 ± 0,07	0,25	0,00	0,16 ± 0,03	0,19	0,12	0.73
29	20-25	3,6-3,8	1,11 ± 0,30	1,38	0,62	0,94 ± 0,14	1,13	0,70	0.26
31	20-25	3,2-3,4	0,51 ± 0,23	1,02	0,18	0,34 ± 0,15	0,59	0,15	<b>0.07</b>
33	15-20	4,1-4,3	0,14 ± 0,14	0,45	0,00	0,00 ± 0,00	0,15	0,00	0.13

---

35	70-75	6,0-6,2	$0,20 \pm 0,07$	0,26	0,00	$0,00 \pm 0,00$	0,22	0,00	0.38
----	-------	---------	-----------------	------	------	-----------------	------	------	------

---





A frequência de aparecimento das bandas protéicas 3, 5, 17, 19 e 31, que apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,06$ ) entre as amostras de reprodutores de alta e baixa qualidade de sêmen encontram-se expressas na Tabela 15

TABELA 15- Frequência de aparecimento das bandas protéicas 3, 5, 17, 19 e 31 conforme a fertilidade dos garanhões

Proteínas	Qualidade de sêmen /Frequência (%)	
	Alta Qualidade	Baixa qualidade
3	80	100
5	60	0
17	100	100
19	70	0
31	100	100

Ao se analisar a Tabela 15, verifica-se que as bandas protéicas 17 e 31 foram detectadas em 100% das amostras de plasma seminal de garanhões de alta e de baixa qualidade de sêmen. Por outro lado, a proteína 3 foi evidenciada em 100% das amostras de baixa qualidade e em somente 80% das amostras de alta qualidade de sêmen. As bandas 5 e 19 estão presentes em 60 e 70% das amostras de garanhões de alta qualidade respectivamente, no entanto, não foram evidenciadas nas amostras de baixa qualidade

#### 4.2.5 Discussão

Neste estudo, foram encontradas 17 bandas protéicas de densidade óptica variada e peso molecular entre 10 e 80 kDa e pI 3,2-8,2. Com base no peso molecular e pI aproximado, as bandas protéicas podem corresponder a proteínas específicas do plasma seminal equino, já descritas na literatura.

Pelo peso molecular e pI encontrados, tanto a banda protéica **3** (75-80 kDa, pI 8,0-8,2) como a proteína **5** (75-80 kDa, pI 8,5-8,7) podem corresponder à lactoferrina, uma proteína de 80 kDa, de ligação

ao ferro e ao espermatozóide (Jin *et al.*, 1997), identificada no fluido epididimário do garanhão (Fouchecourt *et al.*, 2000), cujo papel fisiológico no plasma seminal ainda é desconhecido (Inagaki *et al.*, 2002). Foi encontrada homologia entre a lactoferrina e outra proteína do plasma seminal humano, a transferrina, cuja concentração foi significativamente ( $P < 0,001$ ) correlacionada com a percentagem de espermatozoides móveis, bem com a concentração espermática, nesta mesma espécie (Bharshankar & Bharshankar, 2000). No presente estudo, tanto a banda protéica **3**, como a **5**, de pesos moleculares similares com a lactoferrina, que talvez, também no equino, possa apresentar homologia com a transferrina, explicando assim, a presença destas proteínas quantitativamente superiores ( $P < 0,05$ ) no plasma seminal dos reprodutores de alta qualidade do sêmen. Cabe mencionar, que a banda protéica **5** está ausente em todas as amostras dos reprodutores considerados de baixa qualidade do sêmen, observa-se ainda, que ela esteve presente em 60% das amostras de plasma seminal dos reprodutores de alta qualidade de sêmen.

A banda protéica **17** (25-30 kDa, pI 7,5-7,7) com densidade óptica significativamente superior ( $P < 0,05$ ) nos reprodutores de alta qualidade do sêmen, pode corresponder a uma das proteínas predominantes no plasma seminal equino, com 23 kDa e pI 7-8, verificada através de eletroforese bidimensional, por McDowell *et al.* (1996). Outras proteínas mencionadas pelos mesmos autores (10-20 kDa, pI 6-7,5 e 23 kDa, pI 4-5) pelos pesos moleculares aproximados e pI encontrados, podem corresponder às proteínas **21** (10-15 kDa, pI 6,2-6,4) e **27** (20-25 kDa, pI 4,0-4,2) encontradas neste estudo. Como a pesquisa destes autores é meramente descritiva, e não é abordada a função destas proteínas no plasma seminal equino, torna-se temerário à atribuição de qualquer inferência da presença quantitativamente superior da banda protéica **17** nos garanhões com alta qualidade do sêmen.

A banda protéica **19** (25-30 kDa, pI 8,5-8,7), é provável tratar-se da CRISP 3 (26 kDa, pI 8-9), detectada por Schambony *et al.* (1998) no plasma seminal equino. Até então, esta proteína secretória, rica em cisteína, havia sido identificada em ratos (Cameo & Blaquier, 1976) e no homem (Kasahara *et al.*, 1989). Esta proteína mostrou seqüência homóloga à HSP-3 (Magdaleno *et al.*, 1997), isolada e caracterizada por Calvete *et al.* (1994) no plasma seminal equino. Como a CRISP-3 / HSP-3 cobre a região pós-acrossomal e peça intermediária do espermatozóide ejaculado, Magdaleno *et al.* (1997) atribuíram-lhe um papel de proteção na célula espermática. Como as proteínas da família CRISP estão envolvidas no processo de fertilização, em outras espécies, Schambony *et al.* (1998) sugeriram que teriam função semelhante em equinos. A proteína **19** avaliada sob o ponto de vista dos valores da densidade óptica, apresentou-se superior ( $P < 0,05$ ) nas amostras dos reprodutores de alta qualidade do sêmen. Nas amostras dos reprodutores considerados de baixa qualidade do sêmen, a referida banda está ausente em todos os animais, observa-se ainda que ela esteve presente em 70% das amostras de plasma seminal dos reprodutores de alta qualidade de sêmen. A maior quantidade desta proteína no plasma seminal, como foi observado nas amostras dos reprodutores de alta qualidade do sêmen neste estudo, poderia ser atribuído ao papel de proteção da célula espermática conferido por esta proteína.

A banda protéica **31** (20-25 kDa, pI 3,2-3,4) presente em todas as amostras de plasma seminal analisadas e com densidade óptica significativamente superior ( $P < 0,05$ ) nas amostras dos reprodutores do grupo de alta qualidade de sêmen, pode corresponder à CRISP 1 (31,7 kDa, pI 4,7), também denominada glicoproteína ácida epididimária 1 (AEG 1), pertencente às proteínas da família CRISP, proteínas secretórias, ricas em cisteína. A função fisiológica das proteínas CRISP não está totalmente elucidada, mas a expressão tecido-específico da AEG 1 no trato genital masculino sugere um papel potencial na maturação espermática, e possivelmente na fertilização. Na presença de anticorpo anti-AEG 1, os espermatozoides ligam-se ao oócito, mas não ocorre a fusão, indicando a necessidade desta proteína para que ocorra o processo da fertilização (Cohen *et al.*, 2000). A maior quantidade desta proteína no plasma seminal, como foi observado nas amostras dos reprodutores de alta qualidade do sêmen neste estudo, poderia também ser atribuído ao provável papel de proteção da célula espermática por esta proteína, pois pertence às proteínas da família CRISP.

As demais proteínas, descritas a seguir, não apresentaram diferença significativa nas amostras de plasma seminal dos reprodutores de alta e baixa qualidade do sêmen.

A proteína **7**, de peso molecular entre 65-70 kDa, pI 6,8 a 7,0 pode corresponder a osteopontina (72 kDa, pI 5,6). A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína ácida,

inicialmente identificada e isolada da matriz óssea bovina (Franzen & Heinegard, 1985), que também está presente foi identificada nas células de Sertoli, epitélio seminífero e cauda do espermatozóide de ratos (Siiteri *et al.*, 1995).

A natureza ácida da osteopontina foi atribuída à grande quantidade de ácido aspártico e ácido glutâmico (Franzen & Heinegard, 1985). A seqüência N-terminal SSEEK da OPN é considerada como substrato para quinases intracelulares que fosforilam (Pinna *et al.*, 1979), e a seqüência GRGDS está envolvida na adesão celular através de receptores celulares da família integrina (Craig *et al.*, 1989). Os receptores para integrina parecem ter um papel na ligação espermatozóide-óvulo, na pré-implantação e na implantação (Vinatier, 1995).

Foram identificados dois sítios potenciais de ligação à heparina no cDNA da osteopontina do rato (Patarca *et al.*, 1993). O plasma seminal bovino, assim como o equino, contém proteínas de ligação à heparina que, por sua vez, ligam-se ao espermatozóide e regulam a capacitação mediada por heparina (Miller *et al.*, 1990; Calvete *et al.*, 1997).

Killian *et al.* (1993) correlacionaram uma proteína de 55 kDa, pI 4,5, com a fertilidade de touros, através de eletroforese bidimensional e a indicaram como um dos marcadores de alta fertilidade existentes no plasma seminal bovino. Posteriormente, Cancel *et al.* (1999) identificaram esta proteína como sendo a osteopontina. Entretanto, a relação entre esta proteína com a fertilidade ainda não foi bem esclarecida. A relação entre a OPN e a fertilidade pode ser indireta (Cancel *et al.*, 1999), através da proteção da superfície epitelial das glândulas acessórias contra infecções bacterianas, conferida por esta proteína, conforme Brown *et al.* (1992). Estes autores referem que a osteopontina luminal liga-se à receptores da integrina localizados na superfície do epitélio celular, podendo apresentar uma função protetora em infecções bacterianas. Por outro lado, a OPN pode modificar características da membrana plasmática do espermatozóide, favorecendo, assim, a fertilidade (Cancel *et al.*, 1999).

Também foi identificada no plasma seminal equino, uma proteína de 72 kDa, pI 5,6 como sendo a osteopontina. Esta proteína, da mesma forma que a osteopontina bovina, mostrou-se positivamente correlacionada com a fertilidade na espécie equina (Brandon *et al.*, 1999).

Pelo peso molecular e pI aproximados, tanto a banda protéica **9** (35-40 kDa, pI 6,0-6,2), como a proteína **11** (35-40 kDa, pI 5,6-5,8) podem corresponder a uma grupo de proteínas (28-30 kDa, pI 5,9-6,5) verificadas por Frazer & Bícchi (1996) no plasma

seminal eqüino, e que os autores sugeriram tratar-se das mesmas proteínas BSP do plasma seminal bovino.

Pelo peso molecular e pI encontrados, tanto a banda protéica **13** (35-40 kDa, pI 6,8-7) como a proteína **15** (30-35 kDa, pI 6,5-6,7) podem corresponder à prostaglandina D sintetase, uma proteína de 30 kDa, pI 4-7 encontrada no fluido epididimário, testicular e plasma seminal do carneiro e do eqüino, cuja função na proteção ou maturação espermática é desconhecida (Fouchecourt *et al.*, 2000). Em reprodutores bovinos, uma prostaglandina D sintetase tipo lipocalina de 26 kDa pI 6,2 foi relacionada à alta fertilidade (Killian *et al.*, 1993) e a maiores índices de congelabilidade do sêmen por Roncoletta *et al.*, (2000). Entretanto, Jobim (2001) observou índices superiores desta proteína no plasma seminal de bovinos com baixa congelabilidade do sêmen.

A banda protéica **23** (15-20 kDa, pI 6,0-6,2) é provável tratar-se da HSP-2, uma proteína de 25 kDa, pI 6,5-6,9, que foi caracterizada por Calvete *et al.* (1997) como pertencente a família das espermadesinas e das proteínas de ligação à heparina do plasma seminal bovino. A heparina é um glicosaminoglicano, isto é, um polissacarídeo de alto peso molecular, que se liga ao espermatozóide bovino através de proteínas, e é capaz de induzir a capacitação (Lenz *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1990). Tal efeito é obtido através da modulação na atividade da proteína à qual ela se liga. Glicosaminoglicanos semelhantes à heparina são secretados, particularmente na fase folicular, pelo trato reprodutivo da fêmea, o que estimula a capacitação (Lenz *et al.*, 1983). Além disso, essas proteínas de ligação à heparina cobrem a superfície do espermatozóide ejaculado (Miller *et al.*, 1990). No plasma seminal bovino, as principais proteínas de ligação à heparina são as BSP (proteínas do plasma seminal bovino) e no eqüino são as HSP (*horse seminal plasma proteins*).

Os experimentos de Bellin *et al.* (1996) mostraram que reprodutores bovinos, com proteína de ligação à heparina (HBP) em suas membranas espermáticas eram mais férteis que aqueles cuja HBP não era detectável. Os reprodutores com as HBPs (30, 24 e 21 kDa) em suas membranas tinham a maior fertilidade (81,5%). Quando a HBP-24 kDa estava ausente, havia uma redução na fertilidade (61,3%); quando não possuíam HBP em suas membranas, a fertilidade foi a mais baixa (41,9%).

A banda protéica **29** (20-25 kDa, pI 3,6-3,8) pode corresponder a HSP-1, outra proteína de ligação à heparina do plasma seminal eqüino, caracterizada por Calvete *et al.* (1997), possuindo as mesmas funções acima mencionadas, com peso molecular entre 22-25 kDa e pI 4,6-5,18.

A banda protéica **25** (10-15 kDa, pI 5,6-5,8) deve corresponder a HSP-7, uma proteína de 14 kDa, cuja estrutura foi determinada por Reinert *et al.* (1996) que a

classificaram como pertencente a família das espermedesinas e encontraram 98% de identidade com a AWN do plasma seminal suíno. Esta proteína tem um papel de ligação à zona pelúcida, da mesma forma que a AWN suína (Reinert *et al.*, 1996).

As bandas protéicas **33** (15-20 kDa; pI 4,1-4,3) e **35** (70-75 kDa; pI 6,0-6,2) podem corresponder respectivamente às proteínas SP3 (18 kDa; pI 4,3) e SP2 (75 kDa; pI 6,5) descritas por Brandon *et al.*, (1999), negativamente correlacionadas com a fertilidade. Entretanto, a banda protéica **33** também pode tratar-se de uma proteína de 19,6 kDa, quantitativamente correlacionada com a motilidade pós descongelamento observada por Amann *et al.* (1987).

4.3 EXPERIMENTO 3 Influência do plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática na motilidade e integridade e funcionalidade de membrana plasmática de espermatozóides de garanhões com alta qualidade espermática e vice-versa.

#### 4.3.1 Animais

Foram utilizados 4 garanhões, da raça Puro Sangue de Corrida, alojados em centros criatórios da grande Porto Alegre, sendo 2 de alta qualidade de sêmen (AQ) e 2 de baixa qualidade de sêmen (BQ), considerando-se a motilidade espermática e alterações morfológicas (Tabela 13). Estes animais possuíam entre 8 e 18 anos de idade. A alimentação era à base de aveia, ração comercial e feno de alfafa.

#### 4.3.2 Delineamento Experimental

Os garanhões tiveram previamente seu sêmen coletado (3.1) para realizar um banco de plasma seminal. Para tanto, o sêmen foi centrifugado a 3000g por 20 minutos, o plasma seminal retirado, novamente centrifugado a 3000g por 20 minutos, avaliado para verificar se continha alguma célula espermática, dividido em alíquotas de 1,5 ml, identificado e congelado a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Quando da utilização, o plasma seminal foi descongelado em banho-maria a  $+37^{\circ}\text{C}$ .

Foram realizadas 5 coletas de sêmen de cada garanhão, através de vagina artificial (3.1), perfazendo um total de 20 coletas. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade (3.2.2) e concentração (3.2.3), e diluído 1:2 com EDTA-glicose<sup>10</sup>, dividido em cinco alíquotas e centrifugado a 600g, por 10 minutos, para remoção do plasma seminal. O *pellet* de cada alíquota foi

---

<sup>10</sup> Merck 1 Minitüb GmbH, Alemanha

ressuspendido com uma determinada quantidade de plasma seminal, do banco de plasma, acrescido de um determinado volume de Leite UHT (3.3.1), até atingir uma concentração final entre 40 a  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Nos garanhões considerados de alta qualidade de sêmen, foi acrescido ao *pellet*, após a centrifugação, plasma seminal de garanhões de baixa (BQ) e de alta (AQ) qualidade de sêmen, em concentrações finais de 2,5% e 5%. Em um quinto grupo, o sêmen foi diluído somente com Leite UHT (3.3.1), sem plasma seminal. Da mesma forma, os garanhões considerados de baixa qualidade de sêmen tiveram o *pellet* acrescido de plasma seminal de garanhões AQ e BQ, em concentrações finais de 2,5% e 5%. Em um décimo grupo, o sêmen foi diluído somente com diluente, sem plasma seminal. Desta forma, constituíram-se os seguintes grupos de tratamento:

- 0% AQ -** 0% de plasma seminal + espermatozoides de AQ
- 2,5% AQ/AQ -** 2,5 % de plasma seminal AQ + espermatozoides de AQ
- 5,0% AQ/AQ -** 5 % de plasma seminal AQ + espermatozoides de AQ
- 2,5% BQ/AQ -** 2,5 % de plasma seminal BQ + espermatozoides de AQ
- 5,0% BQ/AQ -** 5 % de plasma seminal BQ + espermatozoides de AQ
- 0% BQ -** 0% de plasma seminal + espermatozoides de BQ
- 2,5% BQ/BQ -** 2,5 % de plasma seminal BQ + espermatozoides de BQ
- 5,0% BQ/BQ -** 5 % de plasma seminal BQ + espermatozoides de BQ
- 2,5% AQ/BQ -** 2,5 % de plasma seminal AQ + espermatozoides de BQ
- 5,0% AQ/BQ -** 5 % de plasma seminal AQ + espermatozoides de BQ

Imediatamente após a diluição, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade (3.2.2) progressiva e total e funcionalidade (3.2.4) e integridade (3.2.3) de membrana plasmática. A seguir, os dez frascos contendo o sêmen, com um volume aproximado de 12 ml, foram resfriados em incubadora, a  $+4^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de resfriamento de  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Brinsko *et al.*, 1999) e reavaliado às 24h, 48h e 72h horas.



### 4.3.3 Análise Estatística

Foi utilizada a análise de variância. Para serem analisados por este procedimento, os dados percentuais foram transformados em ângulos correspondentes ao arco-seno da raiz quadrada da proporção. Foram adotado o modelo de parcelas subdivididas, com tratamentos (diluentes) nas parcelas principais, arranjados em blocos casuais (coletas) e com os tempos nas sub-parcelas. Como teste complementar para comparação das médias será utilizado o teste de Tukey.

### 4.3.4 Resultados

Na Tabela 16, estão expressos os valores médios de motilidade total do sêmen de garanhões de alta e de baixa qualidade espermática sem a presença de plasma seminal, nos diferentes tempos de observação.

Tabela 16- Motilidade total do sêmen de garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen sem plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento.

Qualidade	Motilidade total (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%AQ	74 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>
0%BQ	54 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>

(a,b; p= 0,0204) letras diferentes representam diferença significativa

Observando-se a Tabela 16, é possível verificar que os garanhões de alta qualidade espermática tiveram motilidade total significativamente (p=0,0204) melhor em todos os tempos de observação que os garanhões de baixa qualidade.

Nas Tabelas 17 e 18 estão expressos os valores médios da motilidade total de espermatozóides de garanhões de alta e de baixa qualidade espermática, armazenados a +4°C nos diferentes tempos de observação, com diferentes concentrações e qualidades de plasma seminal. Na análise, observaram-se diferenças significativas (p=0,0009) para tratamento dentro de cada grupo de qualidade do

sêmen (AQ e BQ) e para o efeito tempo ( $p=0.0001$ ). Não se observaram interações entre qualidade do sêmen (AQ e BQ) e tempo de armazenamento ( $p=0,1073$ ) e para tratamento, dentro de cada grupo de qualidade do sêmen (AQ e BQ), e tempo de estocagem ( $p=0,8070$ ).

Tabela 17- Motilidade total média do sêmen de garanhões de alta qualidade espermática acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Motilidade total (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0% AQ	75	60	42	30
2,5% AQ/AQ	79	60	46	32
2,5% BQ/AQ	77	53	37	27
5% AQ/AQ	80	56	39	28
5% BQ/AQ	78	56	38	27

Tabela 18 – Motilidade total média do sêmen de garanhões de baixa qualidade espermática acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Motilidade total (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%BQ	56	30	19	12
2,5% AQ/BQ	54	30	21	13
2,5% BQ/BQ	56	26	18	9
5% AQ/BQ	54	26	16	8
5% BQ/BQ	55	27	15	7

Ao se analisar a Tabela 17 é possível verificar que o sêmen de garanhões de alta qualidade espermática, que tiveram acrescidos 2,5% de plasma de garanhões de alta qualidade (**2,5% AQ/AQ**) apresentaram motilidade total significativamente superior no tempo total de armazenamento ao obtido nos tratamentos **2,5% BQ/AQ** ( $p=0,0023$ ), **5% AQ/AQ** ( $p=0,0164$ ) e **5% BQ/AQ** ( $p=0,0028$ ), não se diferenciando

do tratamento **0%AQ** ( $p=0,1618$ ). Nos ganhões de baixa qualidade de sêmen, observou-se melhor motilidade total no tratamento **2,5%AQ/BQ** do que nos tratamentos **5%AQ/BQ** ( $p=0,0269$ ) e **5% BQ/BQ** ( $p=0,0258$ ). Entretanto, o tratamento **2,5%AQ/BQ** não se diferenciou dos tratamentos **0%BQ** ( $p=0,8908$ ) e **2,5%BQ/BQ** ( $p=0,2290$ ) (Tabela 18).

Na Tabela 19, estão expressos os valores médios de motilidade progressiva do sêmen de ganhões de alta e de baixa qualidade espermática sem a presença de plasma seminal, nos diferentes tempos de observação.

Tabela 19- Motilidade progressiva do sêmen de ganhões de alta e baixa qualidade de sêmen sem plasma seminal, resfriado a  $+4^{\circ}\text{C}$ , às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Qualidade do sêmen	Motilidade total (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%AQ	48 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>
0%BQ	30 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>

( a,b;  $p= 0,0346$ ) letras diferentes na coluna representam diferença significativa

Observando-se a Tabela 19, é possível verificar que os ganhões de alta qualidade espermática tiveram motilidade progressiva significativamente ( $p=0,0346$ ) melhor em todos os tempos de observação que os ganhões de baixa qualidade.

Nas Tabelas 20 e 21 estão expressos os valores médios da motilidade progressiva de espermatozóides de ganhões de alta e de baixa qualidade espermática, armazenados a  $+4^{\circ}\text{C}$ , nos diferentes tempos de observação, com diferentes concentrações e qualidades de plasma seminal. Na análise, observaram-se interações ( $p=0,0027$ ) entre tratamento dentro de cada grupo de qualidade do sêmen (AQ e BQ) e para o tempo de armazenagem ( $p=0,0001$ ). Observou-se interação entre qualidade do sêmen (AQ e BQ) e tempo de estocagem ( $p=0,0001$ ). No entanto, não foi detectada interação para tratamento, dentro de cada grupo de qualidade do sêmen (AQ e BQ), e tempo de armazenagem ( $p=0,2798$ ).

Tabela 20- Motilidade progressiva média do sêmen de garanhões de alta qualidade espermática, acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Motilidade progressiva média(%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%AQ	49 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>
2,5% AQ/AQ	57 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
2,5% BQ/AQ	54 <sup>b</sup>	26 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>
5% AQ/AQ	54 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>
5% BQ/AQ	52 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>

Tabela 21- Motilidade progressiva média do sêmen de garanhões de baixa qualidade espermática, acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Motilidade progressiva média(%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%BQ	30	15	8	5
2,5% AQ/BQ	27	15	10	7
2,5% BQ/BQ	31	12	7	4
5% AQ/BQ	32	13	7	3
5% BQ/BQ	31	14	7	3

Ao se analisar a Tabela 20 é possível verificar que o sêmen de garanhões de alta qualidade espermática, ao qual foram acrescidos 2,5% de plasma de garanhões de alta qualidade (**2,5%AQ/AQ**) apresentaram motilidade progressiva significativamente superior ( $p < 0,0082$ ) no tempo total de armazenamento quando comparados aos demais grupos. No entanto, apesar de apresentar na média dos tempos de observação os melhores resultados de motilidade progressiva, o grupo **2,5%AQ/BQ** não se diferenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) dos demais grupos de tratamento entre os garanhões de baixa qualidade de sêmen (Tabela 21).

Nas Tabelas 22 e 23 estão expressos os valores médios de espermatozóides com a membrana funcional de ganhões de alta e de baixa qualidade espermática, armazenados a +4°C nos diferentes tempos de observação, com diferentes concentrações e qualidades de plasma seminal. Na análise, observaram-se diferenças significativas ( $p=0,0001$ ) para tratamento dentro de cada grupo de qualidade do sêmen (AQ e BQ) e para o efeito tempo ( $p=0,0001$ ). Observou-se interação entre qualidade do sêmen (AQ e BQ) e tempo ( $p=0,0086$ ). No entanto, não foi detectada interação para tratamento, dentro de cada grupo de qualidade do sêmen (AQ e BQ), e tempo ( $p=0,9756$ ).

Tabela 22- Valores médios de espermatozóides com a membrana funcional de ganhões de alta qualidade espermática acrescido de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriado a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Espermatozóides com membrana funcional(%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%AQ	56	42	32	28
2,5% AQ/AQ	56	41	32	27
2,5% BQ/AQ	54	42	32	26
5% AQ/AQ	52	39	30	27
5% BQ/AQ	50	39	31	25

Tabela 23- Valores médios de espermatozóides eqüinos com a membrana funcional de garanhões de baixa qualidade espermática acrescidos de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriados a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Espermatozóides com membrana funcional(%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%BQ	43	33	31	24
2,5% AQ/BQ	40	33	33	21
2,5% BQ/BQ	43	37	35	27
5% AQ/BQ	42	31	31	20
5% BQ/BQ	38	33	30	21

Ao se analisar a Tabela 22, é possível verificar que os espermatozóides de garanhões de alta qualidade espermática, aos quais foram acrescidos 5% de plasma de garanhões de baixa qualidade (**5%BQ/AQ**), apresentaram percentagem de membrana funcional significativamente inferior no tempo total de armazenamento ao obtido nos tratamentos **2,5%AQ/AQ** ( $p=0,0127$ ); **0%AQ** ( $p=0,0189$ ) e **2,5%BQ/AQ** ( $p=0,0557$ ), não se diferenciando do tratamento **5%AQ/AQ** ( $p=0,6080$ ). Nos garanhões de baixa qualidade de sêmen observou-se maior número de espermatozóides com membrana funcional no tratamento **2,5%BQ/BQ** do que nos demais tratamentos ( $p<0,0091$ ) (Tabela 23).

Nas Tabelas 24 e 25 estão expressos os valores médios de espermatozóides eqüinos com a membrana íntegra de garanhões de alta e de baixa qualidade espermática, armazenados a +4°C nos diferentes tempos de observação, com diferentes concentrações e qualidades de plasma seminal. Na análise observaram-se diferenças significativas ( $p=0,0006$ ) para tratamento dentro de cada grupo de qualidade do sêmen (AQ e BQ) e para o efeito tempo ( $p=0,0001$ ). Não se observou interação entre qualidade do sêmen (AQ e BQ) e tempo ( $p=0,1338$ ) e para tratamento, dentro de cada grupo de qualidade do sêmen (AQ e BQ), e tempo ( $p=0,9528$ ).

Tabela 24- Valores médios de espermatozóides com a membrana íntegra de garanhões de alta qualidade espermática, acrescidos de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriados a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Espermatozóides com a membrana íntegra (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%AQ	61	54	43	34
2,5% AQ/AQ	61	55	45	36
2,5% BQ/AQ	58	57	43	34
5% AQ/AQ	61	55	44	34
5% BQ/AQ	59	52	42	32

Tabela 25- Valores médios de espermatozóides com a membrana íntegra de garanhões de baixa qualidade espermática, acrescidos de diferentes qualidades e quantidades de plasma seminal, resfriados a +4°C, às 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento

Tratamento	Espermatozóides com membrana íntegra (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0%BQ	42	40	37	31
2,5% AQ/BQ	45	38	36	34
2,5% BQ/BQ	54	41	41	34
5% AQ/BQ	42	35	29	32
5% BQ/BQ	45	40	34	31

Ao se analisar a Tabela 24, é possível verificar que os espermatozóides de garanhões de alta qualidade espermática, aos quais foram acrescidos 2,5% de plasma de garanhões de alta qualidade (**2,5%AQ/AQ**) apresentaram percentagem de membrana íntegra significativamente superior no tempo total de armazenamento ao obtido no tratamento **5%BQ/AQ** ( $p=0,0328$ ); não se diferenciando dos demais tratamentos. Nos garanhões de baixa qualidade de sêmen observou-se maior número de espermatozóides com membrana íntegra no tratamento **2,5%BQ/BQ** do que nos demais tratamentos ( $p<0,0251$ ) (Tabela 25).

#### 4.3.5 Discussão

A motilidade total e progressiva foi preservada, no presente experimento, por 72 horas, com valores semelhantes aos obtidos por Mattos (1995), Keller *et al.* (2001) e Vieira *et al.* (2002). Estes resultados devem-se principalmente ao diluente utilizado, à curva de resfriamento e à concentração espermática da amostra (Mattos, 1995).

Os resultados de integridade e funcionalidade de membrana foram semelhantes aos obtidos por Vieira *et al.* (2002), que utilizou diluente e curva de resfriamento semelhantes ao do presente trabalho.

Observaram-se diferenças significativas, durante todo o armazenamento, entre os ganhões de AQ e BQ, nas amostras sem plasma seminal, em relação à motilidade total ( $p=0,0346$ ) e à motilidade progressiva ( $p=0,0204$ ). No entanto, não se observaram diferenças nos dois grupos, quando se avaliou a funcionalidade de membrana ( $p=0,2103$ ) e sua integridade ( $p=0,066$ ). Estes resultados demonstram, que o principal diferencial entre os animais de AQ e BQ na ausência de plasma seminal foi a motilidade.

Constatou-se, no decorrer do experimento, que nos ganhões, de AQ e de BQ, a motilidade, progressiva e total, foi influenciada pela qualidade e concentração do plasma seminal adicionado. Tanto a motilidade total como a progressiva foram superiores nos animais que receberam 2,5% de plasma de animais de AQ. A funcionalidade e a integridade de membrana foram influenciadas, principalmente, pela concentração de plasma do que pela qualidade do mesmo. Enquanto, que nos animais de AQ os melhores resultados foram obtidos com 2,5% de plasma de AQ e de BQ, nos animais de BQ os melhores percentuais foram verificados com 2,5% de plasma BQ.

Os resultados de motilidade coincidem com os obtidos por Vianna *et al.* (2002), que observaram melhora da motilidade, total e progressiva, nos ganhões aos quais se adicionou plasma proveniente de animais de alta qualidade. No entanto, não coincidem com os apresentados por Beelmann (1994), que não encontrou



diferenças significativas na motilidade e nos índices de prenhez, quando colocou plasma seminal de animais com histórico de boa fertilidade em animais com baixa fertilidade e vice-versa. Nesse experimento os autores congelaram o plasma seminal a  $-18^{\circ}\text{C}$ , o que causa uma desidratação e perda de funcionalidade das proteínas do plasma, que poderia ter levado à inexistência de diferenças na motilidade e na prenhez.

Os melhores percentuais de motilidade obtidos com a adição de 2,5% de plasma de animais de alta qualidade podem ser explicados pela rápida centrifugação do sêmen logo após a coleta, permitindo a retirada de proteínas prejudiciais à motilidade, antes que estas aderissem à membrana plasmática. Da mesma forma, a adição de plasma de alta qualidade permitiu a incorporação de proteínas benéficas à motilidade (Experimento2). Estas proteínas, provavelmente, permitam um melhor transporte de substratos metabólicos, fornecendo uma maior fonte energética para a célula espermática.

A qualidade do plasma seminal não influenciou diretamente a funcionalidade e a integridade da membrana plasmática. No entanto, estas foram influenciadas pela concentração de 2,5% de plasma seminal. Estes resultados coincidem parcialmente com os obtidos no experimento 1, onde se verificou que a integridade de membrana foi superior nas amostras que continham 2,5% de plasma seminal. Observa-se, portanto, da mesma forma que foi verificado nas amostras sem plasma seminal, que a qualidade do sêmen utilizado não se diferenciou quanto à funcionalidade de membrana e sua integridade e somente a concentração de plasma permitiu a existência de diferenças.

Conclui-se que 2,5% de plasma seminal provenientes de ganhões de alta qualidade de sêmen melhora a motilidade de ganhões de baixa qualidade de sêmen e concentrações de 2,5% de plasma seminal melhoram os percentuais de funcionalidade e integridade de membrana.

## 5 Conclusões

- 1 - Concentrações de até 5% de plasma seminal não afetam a motilidade, a funcionalidade e a integridade de membrana plasmática dos espermatozóides;
- 2 - Concentrações de 2,5% de plasma seminal provenientes de garanhões de alta qualidade de sêmen melhora a motilidade de garanhões de baixa qualidade de sêmen;
- 3 - Concentrações de 2,5% de plasma seminal melhoram os percentuais de funcionalidade e integridade de membrana;
- 4 – As bandas protéicas **5** e **19** do plasma seminal não foram identificadas nos garanhões considerados de baixa qualidade de sêmen;
- 5 – As bandas protéicas **3** e **17** apresentaram densidade óptica superior nas amostras de garanhões de baixa qualidade de sêmen, enquanto que a banda protéica **31** foi superior nos animais de alta qualidade, constituindo-se em prováveis marcadores de qualidade;
- 6 - A utilização de leite desnatado UHT, proporcionou os melhores resultados de motilidade e integridade de membrana, em relação ao leite-glicose.



## 6. BIBLIOGRAFIA

AHLEMEYER, B. **Tiefgefrierkonservierung von Seminalplasmas auf Motilität und Kopfkappenintegrität der Samenzellen.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 1991.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal funcion. In: MCKINNON, A. O. : VOSS, J.L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p.715-745. 1992.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopresevation of stallion spermatozoa. **J.Equine.Vet.Sci.**, Wildomar-California, v.7, n.3, p. 145-173, 1987.

AURICH, J.E.; KUHNE, A. ; HOPPE, H. ; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after criopreservation. **Theriogenology**.v.46, n.5, p. 791-797.1996.

BALTES, T.J. **Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of in vitro aging of boar spermatozoa.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, p.102, 1993.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**. V.48, n.3, p.391-410. 1997

BAUMGARTL, C. **Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomstruktur von Pferdespermien.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 1980.

BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg-yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, n. 5, p 955-967.1995.

BEELMANN, V. **Auswirkungen von Seminalplazmazusatz auf die Vitalität von flussigkonserviertem Hengstsperma**. Tese( Doutorado em Medicina Veterinária)-Hannover. 1994.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; VANDERBOOM, R. J.; AX, RL Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 74, n. 1, p 173-182, 1996.

BENNET, J.P. Microelectrophoresis of bull, ram boar & rabbit seminal plasma proteins. In: CONGRESSO INTERNAZIONALE PER LA RIPRODUZIONE ANIMALE E LA FECONDAZIONE ARTIFICIALE, 4., 1965, Trento. **Proceedings**. Trento:[s.n.], 1965. P. 186-189.

BHARSHANKAR, R. N.; BHARSHANKAR, J. R.. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v.44, n. 4, p. 456-460, 2000.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl.23, p. 19-24, 1975.

BIELASNKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. **J. Reprod. Fertil.** Suppl. 27, p. 39-45, 1979.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; HURTGEN, J.P.; CUMMINGS, M.R.; KENNEY, R.M. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Theriogenology**, v.28, n. 4, p. 541-545, 1987.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nord Vet. Med.**, 25:7-8, 383, 1973.

BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, n.5, p.863-873. 1999.

BRINSKO, S.P.; ROWAN, K.R.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, v.8, p.1641-1655. 2000.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. In: Blanchard, T.L.; Varner, D.D. Stallion management. **Vet. Clin. N. AM: Equine Practice**, v.8, n.1, p.205-218, 1992

BROWN, L. F.; BERSE, B.; VAN DE WATER, L.; PAPADOPOULOS-SERGIU, A.; PERRUZZI, C. A.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, H. F., SINGER, D. R. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. **Mol. Biol. Cell**, v.3, v.10, p.169-1180, 1992.

CALVETE, J.; RAID, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphocholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Lett.**, v. 407, n. 2, p. 201-206, 1997.

CAMEO, M. S.; BLAQUIER, J. A. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. **J. Endocrinol.**, v. 69, n.1, p. 47-55, 1976.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the holstein bull reproductive tract. **Biol. Reprod.**, v.60, n.2, p. 454-460, 1999.

CLAY, C.M.; SLADE, N.P.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. Effects of extender, storage temperature and centrifugation on stallion spermatozoal motility and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984, Urbana- champaign- EUA **Proceedings**. Urbana-Champaign – EUA., 1984, v.2, p.186-188.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology.**, v. 22, n.1, p. 25-38, 1984.

COHEN, D. J.; ELLERMAN, D. A.; CUASNICÛ, T. S. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. **Biol. Reprod.**, v.63, n.2, p. 462-468, 2000.

CRAIG, A. M.; SMITH, J. H.; DENHARDT, D. H. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-0-tetradel-canoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n.16, p.9682-9689, 1989.

DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Mol. Reprod. Dev.**, v.37, n.4, p. 425-435,1994.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology.** v.22, n.3, p. 291-304, 1984.

DOTT, D.M. Morphology of stallion spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 23, p. 41-46, 1975.

DREVIUS, L.O . Osmotic behaviour, membrane permeability and mobility mechanisms in bull spermatozoa. **Acta Universitatis Upsaliensis.**, v. 5, p.195, 1972.

DREVIUS, L.O . ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa, **Exp. Cell Res.** 42, n.1, 136-156, 1966.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A ; STEIGER, K.; MATTOS, A .L.G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of skin milk and seminal plasma uterine infusion in mares. **Theriogenology**, v 58, n 2-4, p.491-494, 2002.

FLOWERS, W. L. Boar fertility and artificial insemination. IPVS CONGRSS, 15., 1998, Birmingham. **Proceedings**. Birmingham: [s.n.],1998. P. 45-52.

FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.;DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dinamyc changes of major proteins. **Biol. Reprod.**, v.62, n. 6, p. 1790-1803, 2000.

FRAZER, G. S. ; BUCCI, D. M.; Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology.**, v. 46, n.8, p. 1389-1402, 1996.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochem. J.**, v. 232, n.3, p. 715-724, 1985.



GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v.34, n.4, p.127-138,1986.

GAO, D.Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, P.; MAZUR, P.; CRISTER, J.K. Hiperosmotic tolerance of human spermatozoa – separate affects of glicerol, sodium-cloride, and sucrose on spermolysis. **Biol. Reprod.**, v.49, p.112-123, 1993.

GÖTZE, R. **Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere**. Scharper Verlag, Hannover, 1949.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probe to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 88, n.1, p. 343-353, 1990.

HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**,v.37, p.1241-1252.1992.

HAUGLAND, R.P: Balancing conflicting metabolic demands of exercise and diving. Fed Proc. 1986 Dec;45(13):2948-52.

HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescent probs and research chemicals. **5th ed. Molecular Probs**, inc. Eugene, p.81- 234, 1992.

HOCHACHKA, P.W.; Mantaining coupled metabolism-membrane functions in hipoxia adaptation of diving mammals. FASEB J 46(6): 2238-2238, May 1, 1987

HIDEKI, F.; MASASHI, I.; TAKASHI, K. Correlation between the hypoosmotic swelling test and various sperm function tests. **Int. J. Fertil.**, v. 38, n. 5, p. 311-315, 1993.

HOUSEHOLDER, D.D.; PICKET, B.W.; VOSS, J.L.; OLART, T.T. Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. **Equine Vet. Sci.**, Wildimar- California, v. 1, p. 9-13, 1981

HUGHES, J.P.; LOY, R.G. Artificial Insemination in the Equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. **Cornell Vet**; v.60, p. 463-475, 1970.

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 64, n. 1, 75-77, 2002.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A .; SCHALTNBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUEIRS, E.L. Effect of seminal plasma end egg yolk on motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**. v. 37,n.6, p. 1241-1252, Jun 1992.

JASKO, D.J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, n.5, p.1059-1067, Jun 1991.

JASKO, D.J.; SMITH, K.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.; FOOTE, R.H. A spectrophotometric procedure for the determination of objective measurements of equine spermatozoa motility. **Theriogenology**., v.31, n.5, p. 945-954, May 1989.

JIN, Y. Z.; BANNAI, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L.; OKAMURA, N. Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 47, p. 490-496, 1997.

JEYENDRAN, R. S. VANDERVEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JOBIM, M.M. **Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Veterinária, UFSM, Santa Maria, 2001

JONHSON, L.A.; MAXUEL, W.M.C.; BRISKY, J.R. Staining sperm or viability assessment. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 31, n.1, p. 37-45, 1996.

KAPP, S. **Untersuchungen zur Bestimmung des minimalen zellulären Wassergehaltes im Hinblick auf die Kriokonservierung von equinen Spermatozoen.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Hannover, Tieraztl.Hochsch.,1995

KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. **Pferdeheilkunde**, v. 13, n. 5, p. 508-511, 1997.

KELLER, A. **Efeito de dois métodos de remoção do plasma seminal, de três diluentes e do tempo de armazenamento sobre algumas características espermáticas dos equinos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, UFRGS. 1998.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M.J.; MATTOS,R.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Anim. Reprod. Sci.** v.68, p. 318-319, 2001.

KENNEY, R.M.; HURTTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion.** Hastings- E.U.A., Society for Theriogenology , 1983.

KENNEY, R.M.; KHALEEL, S.A. Bacteriostatic activity of the mare uterus: a progress report on immunologi. **J. Reprod. Fertil., Suppl.** v.23, p. 357-358, 1975

KEYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, E.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p. 601-614, 1992.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v.49, p.1202-1207, 1993.

KLUG, E. New aspects for instrumental insemination of horses. **Tierärztl. Umschau**, v.44, p.489-491, 1989.

KLUG, E. **Untersuchungen zur klinischen Andrologie des Pferdes – die Bedeutung andrologischer Befunde am Hengst für den Zuchteinsatz.** Tese (Livre Docência em Medicina Veterinária). Escola Superior de Veterinária – Hanover, Alemanha, 1982.

KLUG, E. **Frishsamenübertragung beim Pferb. Ein Grundkursus.** Hannover: M. & H. Scharper Alfeld Hannover, v.4, 1993.

KNEISSL, S. **Tiefgefrierkonservierung von PferdeSperma: Einfluss der Samen- entnahmetechnik, zentrifugation, konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilitaet und Membranintegritaet der Samenzellen.** Tese (Doutorado em Medica Veterinária) Hannover, Tierärztl. Hochsch. 1993.

KOHNE, K.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E.; KLUG, E. Osmotische Resistenz von Hengstpermien und deren Beziehungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierungsfähigkeit. **Reprod Dom. Anim.**, Suppl.3, p. 128 abstr. 1995.

KRAUSE, D. **Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der Fertilitäts diagnostischen Bedeutung der Befund.** Tese (Livre Docência em Medicina Veterinária). Escola Superior de Veterinária – Hannover, Alemanha, 1966.

LAGARES, M. A.; **Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengsamenzellen.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1995.

LAGARES, M.A.; MEIRELES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **R. Bras. Cien. Vet.** v. 7, n.3, p. 153-156, 2000.

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Preservação do Sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.** v.26,n.1.p.2942, 1998

LARSON, B.L.; SALISBURY, G.W. Characterization of the bovine seminal plasma proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 206, p. 741-749, 1953.

LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LOOHSE, J. K.; FIRST, N. L.; AX, R. L Chondroitin sulfate facilitates an acrossome reaction in bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 28, p. 683-685, 1983.

LENZ, G.; MANOZZO, L.; GOTTARDO, S.; ACHAVAL, M.; SALBEGO, C.; RODNIGHT, R. Temporal profiles of the *in vitro* phosphorylation rate and immunocontent of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) after kainic acid induced lesions in area CA<sub>1</sub> of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. **Brain Res.**, v. 764, n. 1-2, p. 188-196, 1997.

LIU, D.Y.; DU PLESSIS, Y.P.; NAYADU, P.L.; JOHNSTON, W.I.H., BAKER, H.W.G. The use of *in vitro* fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. **Fertil. Steril.**, v.49, p. 272-277, 1995.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A.M. Water test: A simple method to asses sperm-membrane integrity. **Int. J. Andr.**, v.14, p. 278-282, 1991.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUUGH, W.J.; FARR,A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Boil. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951

McDOWELL, K. J.; LITTLE, T. V.; TIMONEY, P. J.; ADAMS, M. H. Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and supplemented with testosterone. **Res. Vet. Sci.**, v. 61, n. 1, p. 33-37, 1996.

McCALL, J.P. 1969. In: GATHER, C. **Einfluss eines mittels Tyrodemedium modifizierten Magermilchverdünners auf Motilität, Morphologie und Vitalität flussigkonservierten Hengstserma**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 1994.

McLEOD, J.; McGEE, W.R. The semen of the thoroughbred. **Cornell Vet.**, v. 40, p. 233-248,1950.

MAGDALENO, L.; GASSET, M.; VAREA, J.; SCHAMBONY, A. M.; URBANKE, C. RAIDA, N.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. Biochemical and conformational characterization of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **FEBS Lett.**, v. 420, n. 2-3, p. 179-185, 1997.

MAGESTRINI, M. ; MCDONNELL, SUE. M.; SEGUIN , F. ; BEAU, P.; PALMER, E. Analysis of Sex gland markers in equine seminal plasma of in copula and ex copula-induced ejaculates: Quantification by magnetic resonance spectroscopy. SECOND INTERNATIONAL WORKSHOP ON ERECTION AND EJACULATION IN HORSES AND MEN, **Proceedings**, Nouzilly, France, 1996.

MAGESTRINI, M. ; SEGUIN, F. ; BEAU, P. ; AKOKA, S. ; LE PAPE, A ; PALMER, E. H nuclear magnetic resonance analysis of stallion genital tract fluids and seminal plasma: Contribution of the accessory Sex glands to the ejaculate, **Biol. Reprod.** Mono 1, p.599-607, 1995.

MANN, T. Metabolism of Semen: fructolysis, respiration and sperm energetics. In: MANN T., **The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.** New York, Barnes and Noble, 1964, p. 265-307.

MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.23. p.47-52.1975.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN,C., **Male reproduction and semen.** New York, Springer Verlag, p. 23-28, 1981.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl.27, p.45-51, 1979.

MATTOS, R.C.; CAVALHEIRO, E.P. Monta Natural e inseminação artificial com sêmen fresco em éguas cruza árabe. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 10, 1988, Porto Alegre. **Anais**, Porto Alegre, Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, p.46, 1988.

MATTOS, R. **Influencia de diferentes métodos de preservação de semen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, UFRGS.1995.

MATTOS, R.C.; CAVALHEIRO, E.P.; MATTOS, R. ; GREGORY, R.M. Monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco diluído em éguas árabe. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, p.57-64, 1996.

MEIRELES, L.S.; NEVES, A.P.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; MORAES, I.M.A.; GARBADE, P. GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Uso do leite em pó desnatado não inativado e do leite desnatado UHT na preservação e fertilidade do sêmen eqüino resfriado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28,n. 3, p. 467-470, 1998.

MEIRELES,L.S; LAGARES, M.A; BRITO, E.L; SILVEIRA, G.B; CONCEICÃO, T.R.;BAHNIUK, M.C.; PATBST, C.U.; GREGORY, R.M.; GABARDE, P.; MATTOS, R.C. Efeito de diluentes à base de leite desnatado de diversas osmolalidades na preservação do sêmen eqüino resfriado. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**. v.27,n.2.p.52-58, 1999.

MILLER, D. J.; WINER, M. A; AX, R. L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biol. Reprod.**, v. 42, p. 899-915, 1990.



MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A.; CECILIANI, F.; GOTTARDINI, L.; MAFFEO, G.; RONCHIS, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis** v.19, n.5, p.797-801, 1998.

O'FARREL, P.H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem**, v.250, p. 4001-4021, 1975.

O'FARREL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARREL, P.H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133-1142, 1977.

OVERSTREET, J.W.; TOM, R.A.; Experimental studies of rapid sperm transport in rabbits. **J. Reprod. Fertil. Supl.** 60, p.601-606, 1982.

PADILLA, A. W.; FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 3308-3313, 1991.

PALMER, E. L'insemination artificielle des juments: bilan de 5 années de recherche et d'utilisation pratique. In: **Le Cheval, Reproduction Selection, Alimentation Exploitation**, INRA (ed), 133, 1984.

PAPA, F.O.; MARTIN, J.C.; KRAUSE, A.; KLUG, E. Influência da centrifugação sobre a motilidade do sêmen de eqüinos em resistência térmica e congelamento. **Ciênc. Biol.**, v. 2, p. 31-39, 1981.

PATARCA, R.; SAAVEDRA, R. A.; CANTOR, H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 225-246, 1993.

PINNA, L. A.; DONELLA-DEANA, A.; MEGGIO, F. Structural features determining the site specificity of rat liver cAMP-independent protein kinase. **Biochem. Biophys. Res.**, v.87, p. 114-120, 1979.

PICKETT, B.W.; VOOS, J.L. Reproductive management of the stallion. IN: 18<sup>TH</sup> ANNUAL CONVENTION A.A.E.P, **Proceedings.**, P.501-531, 1972.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENGA, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **American Fertility Society**,v.26, No.2, 1975.

PICKETT, B.W.;FAULKNER, L.C.; SEIDEL, G.E.; BERNDTSON, W.E; VOSS, J.L. Reproductive physiology of stallion. VI - Seminal and behavioral characteristics. **J. Anim. Sci.**, 43,p. 617-625, 1976.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, n. 5, p.289-302, 1987.

PICKETT, B.W. Seminal extender and cooled semen. In: MCKINNON, A. O. : VOSS, J.L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p.746-754.1992.

PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; AMANN, P.R. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extender equine spermatozoa. **Theriogenology**. v.23, p. 925-934, 1985.

REINERT, M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MANN, K.; TOPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **Eur. J. Biochem.** v. 242, n. 3, p.636-640, 1996.

RODNIGHT, R.; ZAMANI, R., TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **J. Neurosci. Meth.**, v.24, p. 27-38, 1988.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C; FRANCESCHINI, P. H.; RAMOS, P. R. R. Caracterização da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p. 323, 2000.

SCHAMBONY, A.; GENTZEL, M.; WOLFES, H.; RAIDA, M.; NEUMANN, U.; TOPFER-PETERSEN, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. **Biochem. Bioph. Acta.** v. 1387, n. 1-2, p. 206-216, 1998.

SIEME, H.; PETZOLDT, R.; KAPP, E.; TÖPFER-PETRESEN, E.; KLUG, E. Analyses to determine the minimum cellular water content under defferent storage conditions in relation to preservation of stallion spermatozoa. In: INT. Pretoria, south America: University of Pretoria, P. 31-32. 1998.

SIITERI, J. E.; ENSRUD, K. M.; MOORE, A., HAMILTON, D. W. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 40, p. 16-28, 1995.

SQUIRES, E.L.; AMAN, R.P.; MACKINNON, A. O.; PICKETT, B.W. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5 or 20°C. In. INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988, Haia. **Proceedings**. Haia, v.3, p.297-299, 1988.

SZUMOWSKI, P. Quelques résultats de l'examen életrophoreétique des protéines du plasma seminal de taureau. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 3., 1956, Cambridge, **Proceedings**. Cambridge [s.n.], P.102-105, 1956.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine response to semen deposition in the mare. IN: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1995. **Proceedings**. San Antonio, Texas, p.130-134, 1995.

TROEDSSON, M.H.T.; FRANKLIN, R.K.; CRABO, B.G. Suppression of PMN-chemotaxis by different molecular weight fractions of equine seminal plasma. **Pferdeheilkunde**, v.15, p.568-573.1999.

VAN DER HOLST, W. Stallion semen production in artificial insemination programs in the Netherlands. In COUROT, M. **The male in Farm Animal Reproduction**. Boston: Courout Martinus Nijhoff publishers, p.195-201, 1984.

VAN HUFFEL, X.M.; VARNER, D.D.; HINRICHS, K.; GARCIA, M.C.; STRZEMIENKI, P.J.; KENNEY, R.M. Photomicrographic evaluation of stallions spermatozoa motility characteristics. **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, p. 1272-1275, 1985.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. ;LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**,v.28,No.5.p.709-723.1987.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storega temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

VARNER, D.D. Composition of seminal extenders and its effect on motility of equine spermatozoa. **ANNUAL METTING – SOCIETY OF THERIOGENOLOGY, 1991**, Proceedings, p.146-150, 1991.

VESSELINOVITCH, S.D. Electrophoresis of bovine semen. Part.III. Characterization of the seminal plasma proteins. **Canad. J. Comp. Med.**, v. 23, n. 1, p. 10-20, 1959.

VINATIER The important role of integrins in reproductive processes. **Eur J Obstet Gynec. Reprod. Biol.** Oct;62(2):263-4, 1995.

VIANNA, S.A.B.; SOUZA, G.V.; FAGUNDES, B.; FONSECA, C.W.; MAEDA, M.; GUIMARÃES, M.C.; MATTA, M.F.R.; MATTA, C.G.F.; TILBURG, M.F.; SILVA, J.F.S. A influência do plasma seminal na congelabilidade de sêmen equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.3, 2002.

VIEIRA, M. J.; HÖTT, A .K.; MALSCHITZKY, E.; KELLER, A.; WALD, V.B.; MATTOS, A.L.G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Antimicrobial agents in extender and their effect on semen preservation and pregnancy rate of inseminated mares. **Theriogenology**. n.58, p.667-670. 2002

VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; Reproductive management of the broodmare. Colorado State University, **Anim. Reprod. Lab.**, p.22, 1976.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In Morris, G.J. & Clarke, A. **Effects of low temperatures on biological membranes**. New York, Academic Press, p.189-218,1981.

WEITZE, K.F.; MÜLLER, E. Prinzipien der spermauntersuchung. In: **Künstliche Besamung bei Nutztieren**. BUSH, W.; LÖHLE, K.; PETER, W. (Eds.), Stuttgart: Gustav Fischer, P.269-310. 1991.

WÖCKENER, A.; PAPA, F.O.; SIEME, H.; BADER, H. Untersuchngen zur Flüssigsamenkonservierung von Hengstsperma. **Pferderheilkunde**., v.6, n. 3, p. 129-135, 1990.