

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

**PERCOLL[®] E PLASMA SEMINAL NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN
EQÜINO A +4°C**

CRISTINA RODRIGUES TREIN

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, Agosto de 2004

Cristina Rodrigues Trein

**PERCOLL[®] E PLASMA SEMINAL NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN
EQÜINO A +4°C**

APROVADO EM

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Petra Garbade
Membro da Comissão

Prof. Dr. Marc Henry
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Alves Pimentel
Membro da Comissão

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

**PERCOLL[®] E PLASMA SEMINAL NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN
EQÜINO A +4°C**

O presente estudo visou verificar o efeito sobre alguns parâmetros da seleção por gradiente de Percoll[®] e da adição de plasma seminal do sêmen eqüino preservado a +4°C. O primeiro experimento avaliou a taxa de recuperação de espermatozoides após seleção por Percoll[®] em diferentes protocolos de centrifugação. Foram realizadas 5 coletas de sêmen de um garanhão. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade, vigor e concentração. Foram retiradas duas amostras de 4 mL, diluídas em leite desnatado UHT com concentrações de 50 e 100 x 10⁶ espermatozoides por mL cada. Cada uma destas amostras foi dividida em 4 alíquotas de 1 mL, que foram então colocadas sobre Percoll[®] e submetidas a diferentes tempos e velocidades de centrifugação. V1 - 200 g (5 min) + 800 g (10 min); V2 - 800 g (10 min); V3 - 800 g (15 min); V4 - 800 g (20 min). Após esse processo, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de cada alíquota ressuspendido com 0,5 mL de leite UHT. As 8 amostras foram novamente avaliadas para concentração, motilidade e vigor. O segundo experimento estudou o efeito da adição de plasma seminal de diferentes qualidades ao sêmen eqüino selecionado por gradiente de Percoll[®] e resfriado a +4°C por até 72 horas. Foram utilizados 40 ejaculados de 4 garanhões, sendo dois com boa qualidade de sêmen e dois com baixa qualidade de sêmen. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade, vigor e concentração e preparadas cinco frações de 100x10⁶ espermatozoides, diluídas 1:1 (v/v) em EDTA-Glicose. Quatro delas, constituídas por 1mL a 2mL, foram depositadas sobre Percoll[®]. A fração restante foi centrifugada em tubo de vidro de 10 mL, sob as mesmas condições de tempo e velocidade das demais amostras. Foi realizada centrifugação por 5 minutos em 200 g, seguida de 10 minutos em 800 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com leite UHT desnatado compondo os seguintes tratamentos: **Sp**: 1,5 mL de leite UHT desnatado sem adição de plasma seminal; **Hp**: 1,425 mL de leite UHT desnatado acrescido de 75 µL de plasma seminal homólogo; **Ap**: 1,425 mL de leite UHT desnatado acrescido de 75 µL de plasma seminal do *pool* de alta qualidade; **Bp**: 1,425mL de leite UHT desnatado acrescido de 75 µL plasma seminal do *pool* de baixa qualidade; **Cc**: foi centrifugada sem seleção por Percoll[®], teve seu sobrenadante descartado e ressuspendida com 2 mL de leite UHT; **C** : uma amostra de sêmen diluído em leite UHT foi mantida como controle no processo de armazenamento. As amostras foram resfriadas a +4°C e examinadas a cada 24h até as 72 horas em relação à motilidade, funcionalidade de membrana (teste hiposmótico) e integridade de membrana (CFDA/PI). A seleção por gradiente descontínuo de Percoll[®] 90/45% mostrou-se efetiva na recuperação de espermatozoides com motilidades progressiva e total. A adição de 5% de plasma seminal ou a ausência de plasma não influenciaram os valores da motilidade das

amostras selecionadas por gradiente de Percoll[®]. A seleção por Percoll não influenciou na percentagem de células com membrana plasmática funcional. Concentrações superiores a 2% de plasma seminal resultaram em decréscimo do número de células com membrana funcional, enquanto que as amostras sem plasma seminal apresentaram os melhores resultados e o grupo controle, que apresentava a maior percentagem de plasma, os piores. A utilização de Percoll[®] não separou células com alteração de membrana. A percentagem de células com membrana completamente íntegra foi significativamente maior nas amostras que sofreram processo de centrifugação, independentemente da seleção. O processo de seleção por Percoll[®] foi efetivo na recuperação de espermatozóides de equino com motilidade progressiva, mas não selecionou espermatozóides quanto à funcionalidade nem à integridade de membrana. Concentrações inferiores a 2% de plasma seminal melhoraram a funcionalidade de membrana. A ausência de plasma seminal melhorou os resultados de integridade das membranas plasmática e acrossomal; e a adição de plasma de alta qualidade não melhorou a motilidade de espermatozóides selecionados por Percoll[®].

ABSTRACT

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

PERCOLL[®] AND SEMINAL PLASMA ON THE PRESERVATION OF EQUINE SEMEN AT +4°C

Autor: Cristina Rodrigues Trein

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

*The present study aimed to detect the effect of Percoll gradient selection and of seminal plasma addition on parameters of equine semen preserved at +4°C. The first experiment evaluated sperm recuperation rates after Percoll selection and different centrifugation protocols. Five ejaculates of one same stallion were used. Immediately after collection, semen was evaluated for motility, vigor and count. Two 4 mL semen samples were diluted in UHT skim milk, in the concentrations of 50 and 100 x 10⁶ spermatozoa/mL. Each sample was divided in four 1 mL aliquots, each of them submitted to different centrifugation period and speed: V1 - 200 g (5 min) + 800 g (10 min); V2 - 800 g (10 min); V3 - 800 g (15 min); V4 - 800 g (20 min). Afterwards, the supernatant was discarded and the pellet diluted in 0,5 mL UHT skim milk. Samples were reexamined for count, motility and vigour. The second experiment tested the effect of adding seminal plasma of different qualities to equine semen previously submitted to Percoll selection and preserved at +4°C for up to 72h. Forty ejaculates of 4 stallions were used, two of them with high, and two of them with low quality semen. Immediately after collection, semen was examined for motility, vigour and count. Five semen samples containing 100 x 10⁶ sperm were diluted (1:1) with EDTA – glucose, in a final volume of 1 – 2 mL. Four of them were placed over Percoll. The fifth one was centrifuged in glass tube, at the same time and speed as the others. Samples were centrifuged at 200 g for 5 minutes, and then at 800 g for 10 minutes. Supernatant was discarded and the pellet was diluted in UHT skim milk as follows: **Sp**: 1,5 mL UHT skim milk without seminal plasma; **Hp**: 1,425 mL UHT skim milk with 75µL homologous seminal plasma; **Ap**: 1,425 mL UHT skim milk with 75µL pooled high quality seminal plasma; **Bp**: 1,425 mL UHT skim milk with 75µL pooled low quality seminal plasma; **Cc**: semen sample not submitted to Percoll selection, in which the supernatant was discarded and the pellet diluted in 2 mL UHT skim milk; **C**: semen sample diluted in UHT skim milk, kept as control for preservation. The samples were cooled at +4°C and reexamined each 24 hours since 72 hours for motility, vigour, membrane integrity (CFDA/PI) and functionality (hiposmotic swelling test). Percoll selection was effective to recover equine sperm with progressive and total motility. The addition of 5% seminal plasma or the plasma absence did not influence the motility values of Percoll selected samples. Percoll selection did not influence the percentage of cells with functional plasmatic membrane. Concentration above 2% of seminal plasma did not improve the number of cells with functional membrane, however samples without seminal plasma showed the best results and the control group, containing the higher plasma percentage, the worst. The use of Percoll did not select cells with membrane*

defects. The centrifuged samples had significantly higher percentage of cells with complete membrane integrity, independent of selection. Percoll selection was effective to recover equine sperm with progressive motility, but was not effective to select sperm according to their membrane integrity and functionality. Seminal plasma concentrations inferior to 2% improved membrane functionality. The absence of seminal plasma improved plasmatic and acrossomal membrane integrity; the addition of high quality seminal plasma did not improve the motility of Percoll selected sperm.

1 AGRADECIMENTOS

2

Ao meu orientador, Professor Doutor Rodrigo Costa Mattos, pela orientação na realização deste trabalho e confiança depositada.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Professora Vera Beatriz Wald, pelo auxílio na execução das análises estatísticas.

À Professora Ana Gelpi Mattos, pelo auxílio na correção desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade.

Às colegas Adriana Pires Neves, Bianca Petrucci, Gabriella Möller, pelo apoio na execução deste trabalho.

Às Professoras Enefer Oberst, Maria Inês Jobim e Verônica Schmidt, pela paciência e pelo apoio nas horas difíceis.

Ao Professor Ricardo Macedo Gregory, pela colaboração.

Ao Laboratório de Embriologia e sua equipe, pela tolerância, auxílio técnico-científico e pelo empréstimo de materiais fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos estagiários do REPROLAB que, de alguma maneira, colaboraram nessa jornada.

Aos proprietários, que cederam seus animais em prol da pesquisa.

À minha família, pela constante preocupação e incentivo à minha formação.

Ao meu esposo, Enio, pela compreensão e auxílio em todas as etapas.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Valores médios (%) e desvio-padrão da motilidade total das duas amostras de diferentes concentrações, após seleção por gradiente de Percoll, nos diferentes protocolos de centrifugação **37**
- Tabela 2 - Valores médios (%) e desvio-padrão da motilidade progressiva das duas amostras de diferentes concentrações, após seleção por gradiente de Percoll, nos diferentes protocolos de centrifugação..... **38**
- Tabela 3 - Valores médios (%) e desvio-padrão dos percentuais de espermatozóides recuperados das duas amostras de diferentes concentrações, após seleção por gradiente de Percoll, nos diferentes protocolos de centrifugação..... **38**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gráfico dos valores médios e desvios-padrão de motilidade total de sêmen equino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação.....**41**
- Figura 2: Gráfico dos valores médios de motilidade progressiva de sêmen equino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação.....**42**
- Figura 3 - Gráfico dos valores médios de vigor de sêmen equino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação**43**
- Figura 4 - Gráfico dos valores médios e desvios-padrão de espermatozoides eqüinos com membrana plasmática funcional, após diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação**44**
- Figura 5 – Gráfico dos valores médios de espermatozoides eqüinos com membrana plasmática íntegra, submetidos a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação.....**45**
- Figura 6 - Gráfico dos valores médios de espermatozoides eqüinos com membrana acrossomal íntegra, submetidos a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação.....**46**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	15
2.2	PLASMA SEMINAL	16
2.2.1	O Plasma Seminal na Preservação do Sêmen	17
2.2.2	Efeito do Plasma Seminal no Útero	19
2.3	SELEÇÃO ESPERMÁTICA	20
2.4	CENTRIFUGAÇÃO	23
2.5	AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	25
2.5.1	Motilidade Espermática	25
2.5.2	Morfologia Espermática.....	26
2.5.3	Teste de Funcionalidade de Membrana - Teste Hiposmótico.....	27
2.5.4	Integridade de Membrana - Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (PI).....	29
2.6	RESFRIAMENTO DO SÊMEN.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	ANIMAIS	31
3.1.1	Preparação do plasma seminal	31
3.2	FORMAÇÃO DO GRADIENTE DE PERCOLL.....	32
3.3	COLETA DE SÊMEN	32
3.4	EXAME DO SÊMEN.....	33
3.4.1	Exame microscópico do sêmen.....	33
3.4.2	Motilidade espermática	33
3.4.3	Determinação da concentração espermática	33
3.4.4	Teste de integridade de membrana (CFDA/PI).....	34
3.4.5	Teste de funcionalidade de membrana – teste hiposmótico.....	34
3.5	DILUENTES.....	35
3.5.1	EDTA-Glicose	35
3.5.2	Leite desnatado	35
3.6	RESFRIAMENTO DO SÊMEN.....	35
4	EXPERIMENTOS	36
4.1	EXPERIMENTO 1	36

4.1.1	Animais	36
4.1.2	Diluentes	36
4.1.3	Delineamento Experimental.....	36
4.1.4	Análise estatística.....	37
4.1.5	Resultados	37
4.2	EXPERIMENTO 2	39
4.2.1	Animais	39
4.2.2	Diluentes	39
4.2.3	Delineamento experimental	39
4.2.4	Análise Estatística	40
4.2.5	Resultados	40
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICES.....	61

3 INTRODUÇÃO

O eqüino, dentre as espécies domésticas, apresenta a pior eficiência reprodutiva, com uma taxa de prenhez entre 50 e 60% ao ano (GINTHER, 1992). Sua domesticação para uso como meio de locomoção e no lazer trouxe influências negativas em seu processo de seleção, visto que a necessidade de melhorar a morfologia e o desempenho esportivo dos indivíduos provocou a perda de outras características, como a função reprodutiva (PIMENTEL *et al.*, 1989).

Devido à tecnificação de sua criação e também pelo alto valor agregado de seus produtos, os eqüinos são a espécie animal que maior número de empregos gera mundialmente. O Brasil, cada vez mais, tem demonstrado a qualidade e a capacidade de suas criações em apresentações internacionais, tanto nas corridas, como no salto, tornando o cavalo um produto de exportação.

A inseminação artificial com sêmen fresco é largamente empregada na reprodução eqüina. Sua utilização oferece diversas vantagens sobre a monta natural, como a otimização reprodutiva do uso garanhão, a redução na ocorrência de acidentes durante a cópula e a redução de transmissão de doenças venéreas. No Brasil, atualmente, esta técnica, 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).

A preservação por resfriamento e o transporte de sêmen em temperatura de +5°C para posterior inseminação de éguas são praticas rotineiras na criação de cavalos (JASKO *et al.*, 1991; HATHAWAY, 1992; MATTOS, 1995; BREDFORD *et al.*, 1995), apresentando ótimos resultados em comparação aos obtidos com o sêmen congelado.

A utilização de um diluente adequado é essencial para a proteção do espermatozóide eqüino durante sua estocagem (BATELLIER *et al.*, 1997). Entre os componentes utilizados para formulação de diluentes para sêmen eqüino, estão a gema de ovo e o leite desnatado (PICKETT, 1993), pois protegem os espermatozoides dos efeitos deletérios causados pelo rápido resfriamento do sêmen (VARNER *et al.*, 1987). A ação protetora do leite é conferida por suas lipoproteínas, que estabilizam as membranas dos espermatozoides, permitindo sua adaptação a baixas temperaturas (WATSON, 1981; AMANN & GRAHAM, 1993).

O plasma seminal depende, quantitativa e qualitativamente, das secreções do epidídimo, da ampola do canal deferente, da próstata, das vesículas seminais e das glândulas bulbo-uretrais. A presença dessas secreções em elevada proporção no ejaculado causa, *in vitro*, um efeito negativo na sobrevivência dos espermatozóides (MAGESTRINI *et al.*, 1995), principalmente quando congelado ou estocado a +5°C (JASKO *et al.*, 1991; HATHAWAY, 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 fertilidade (VARNER *et al.*, 1987). O plasma seminal, por outro lado, contém componentes que são importantes para a sobrevivência espermática, é o veículo do ejaculado e contém substratos metabolizáveis pelos espermatozóides (BRANDON *et al.*, 1999), sendo a sua completa retirada, portanto, não aconselhável (PICKETT *et al.*, 1975), quando for realizado o armazenamento do sêmen.

O sêmen equino 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. O plasma seminal é apontado como uma das causas da baixa fertilidade do sêmen resfriado por mais de 24 horas.

O procedimento normalmente adotado para a retirada do plasma seminal é a centrifugação em baixa rotação, não sendo esta prejudicial à sobrevivência dos espermatozóides (PICKETT *et al.*, 1975), pois a centrifugação em altas forças e por tempo superior a dez minutos causa danos à membrana plasmática (KELLER, 1998).

Devido aos critérios de seleção da espécie equina, a subfertilidade pode ser comumente encontrada em garanhões e são necessárias técnicas laboratoriais para aumentar a fertilidade desses animais. Os procedimentos de separação espermática são utilizados para isolar uma população ótima de células morfológicamente normais, com alta motilidade, dos componentes do plasma seminal antes do uso nos procedimentos de fecundação *in vitro* (FIV). Gradientes de densidade separam células com diferentes pesos específicos em diferentes camadas após centrifugação. O gradiente de Percoll[®] remove eficientemente os componentes do plasma seminal e do diluente utilizado na criopreservação (DROBNIS *et al.*, 1991). A seleção por gradiente de Percoll[®] separa as

células espermáticas viáveis dos espermatozoides mortos e lesados, aumentando assim a qualidade e longevidade do sêmen congelado (LEÃO, 2002).

O presente estudo visou verificar o efeito da seleção por gradiente de Percoll[®] e do plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4°C.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Inseminação Artificial

A inseminação artificial com sêmen fresco é permitida por diversas associações de raça (MATTOS, 1995), sendo uma técnica simples e amplamente difundida que 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.*, 1998).

A inseminação artificial em eqüinos foi relatada pela primeira vez em textos árabes de 1322, quando, supostamente, um chefe árabe roubou o sêmen de um garanhão de um rival e inseminou uma égua de sua propriedade, ocorrendo o nascimento de um potro. 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. (MIES FILHO, 1982) Entretanto, A popularização da técnica ocorreu a partir do fim do século XIX, massificando-se com a implantação de grandes programas de inseminação na Rússia e na China (BRINSKO & VARNER, 1992) a partir dos anos 30.

Palmer (1984) relatou índices de prenhez por ciclo similares para monta natural (64%) e inseminação artificial com sêmen puro (76%). Os índices de concepção com sêmen fresco apresentam resultados iguais ou superiores aos obtidos com a monta natural (MATTOS *et al.*, 1996). 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 até 96h entre 0°C e +5°C foram similares: 24h (71,4%), 48h (85%), 72h (50%) e 96h (67%) (HUGHES & LOY, 1970). Mattos (1995) 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, obtendo resultados semelhantes. 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, resultados estes confirmados por Keller *et al.* (2001), que compararam os

índices de prenhez obtidos após inseminação utilizando sêmen fresco e resfriado a +5°C por 24h, utilizando 58 ciclos de éguas Puro Sangue Árabe 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 24h a +5 °C (83%).

4.2 Plasma Seminal

O plasma seminal equino é composto pelas secreções do epidídimo, da ampola do canal deferente, da próstata, das vesículas seminais e das 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; VARNER *et al.*, 1987).

A pré-secreção, que 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, da ampola do canal deferente e da próstata. Já a fração pobre contém baixa concentração de espermatozóides (KELLER *et al.*, 2001).

A glicerilfosforilcolina, produzida no epidídimo, tem importante papel no metabolismo dos lipídios (MANN, 1964) e na maturação dos espermatozóides (MAGESTRINI *et al.*, 1995). A ergotioneína, produzida na ampola do canal deferente, tem a função de proteger os espermatozóides contra agentes oxidantes e peroxidantes (MANN, 1975).

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), mas não é um meio ideal para armazenar

espermatozóides (JASKO *et al.*, 1991). Diversos trabalhos em eqüinos indicam que altas concentrações de plasma seminal podem ter efeitos deletérios sobre a motilidade espermática, após armazenamento por períodos prolongados (PICKETT *et al.*, 1975; VARNER *et al.*, 1987; JASKO, 1991, MAGESTRINI *et al.*, 1995).

4.2.1 O Plasma Seminal na Preservação do Sêmen

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

Em outro experimento, Padilla e Foote (1991) compararam a motilidade e a velocidade espermática de amostras contendo ou não plasma seminal, retirado por centrifugação, utilizando 16 ejaculados de quatro 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 suplementado com meio de Tyrode modificado (TYR). Cada uma dessas amostras foi dividida em duas alíquotas iguais, sendo uma armazenada a +4°C e a outra centrifugada e ressuspendida no mesmo diluente, observando-se uma concentração final de 40 a 50x10⁶ espermatozóides por mL. As alíquotas diluídas foram, também, conservadas a +4°C. A motilidade em cada uma das quatro alíquotas foi avaliada às 0, 24, 48 e 72h. A motilidade dos espermatozóides diluídos em TYR foi maior no sêmen resfriado quando comparado ao sêmen centrifugado que foi diluído em leite desnatado-glicose não suplementado com TYR e sem plasma seminal. Entretanto, espermatozóides diluídos em TYR tiveram motilidade reduzida, na presença do plasma seminal sugerindo uma aparente interação entre plasma seminal e composição do diluente.

Em estudo realizado por Keller *et al.* (2001), foi avaliada a influência da concentração de plasma seminal na manutenção da motilidade espermática do 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 motilidades progressiva e total significativamente superiores ($p < 0,05$) em relação à que continha 17,78% nas 24 h e 48h.

Braun *et al.* (1994) examinaram o efeito do plasma seminal nas características de motilidade do espermatozóide epididimário e ejaculado do equino durante armazenamento a $+5^{\circ}\text{C}$. A motilidade durante o armazenamento do espermatozóide epididimário e ejaculado resfriados foi significativamente melhor preservada em amostras contendo 25% *versus* 0% de plasma seminal.

O efeito de diferentes concentrações de plasma seminal sobre a motilidade espermática também 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%). As amostras de sêmen foram centrifugadas e, após a retirada do sobrenadante, ressuspendidas nos diluentes com as diversas concentrações de plasma seminal. Uma amostra controle diluída em LD-glicose com 25×10^6 espermatozoides/mL foi centrifugada e ressuspendida no próprio sobrenadante (percentagem média de plasma seminal = 13,5%). Todas as amostras foram resfriadas a $+5^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. As amostras centrifugadas com 5% a 20% de plasma seminal tiveram motilidades progressiva e total semelhantes ao controle em todos os tempos de armazenamento. A amostra centrifugada sem adição de plasma seminal teve motilidade progressiva inferior as demais ($p < 0,05$) a partir das 24h de armazenamento.

Em outro estudo, Jasko *et al.* (1991) testaram o efeito da centrifugação, seguida da retirada do plasma seminal, sobre a motilidade espermática em amostras resfriadas a $+5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, utilizando 36 ejaculados de 12 garanhões. Um 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 três diluições diferentes: 100, 50 e 20 $\times 10^6$ espermatozoides/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). Nesse 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.

Concentrações de plasma seminal de 0%, 2,5%, 5% e 10% foram testadas por Schmitt (2002) durante o armazenamento de sêmen resfriado. As diferentes concentrações não influenciaram a motilidade total ($p=0,2921$) nem a motilidade progressiva ($p=0,7441$) nas 0, 24, 48 e 72 horas de avaliação. Também não foi encontrada influência do plasma seminal na funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides resfriados. Entretanto, o sêmen equino diluído em leite desnatado UHT e contendo 2,5% de plasma seminal apresentou maior número de espermatozoides com membrana íntegra que as demais concentrações nas 0, 24, 48 e 72 horas de armazenamento.

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 quatro ganhões: 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 quatro reprodutores foi centrifugado e 90% do plasma seminal retirado. O sêmen dos ganhões de alta motilidade foi ressuspensionado com o plasma dos ganhões de baixa motilidade até uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL e diluído. Procedeu-se da mesma forma com os ganhões de baixa motilidade, a cujos espermatozoides se acrescentou o plasma dos ganhões de alta motilidade. Essas amostras de sêmen foram resfriadas e congeladas. Os autores observaram uma melhora na motilidade progressiva dos espermatozoides dos ganhões de baixa motilidade após a adição do plasma seminal de alta motilidade, tanto no sêmen resfriado como no congelado e concluíram que o plasma seminal tem influência na motilidade de células espermáticas nos diferentes tratamentos térmicos utilizados no processamento de sêmen.

4.2.2 Efeito do Plasma Seminal no Útero

O plasma seminal tem importantes funções na interação com o útero. O plasma seminal contém uma série de substâncias que podem ser responsáveis pela contração da

musculatura lisa do trato genital feminino. Utilizando espermatozóides imóveis suspensos em plasma seminal ou em solução salina, coelhas foram abatidas 15 e 30 minutos após a inseminação. Os autores observaram a 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. Um grande número de espermatozóides de caprino alcançam os ovidutos em 4 horas, quando os espermatozóides foram descongelados em plasma seminal quando comparados em solução tampão (EINARSSON & VIRING, 1973).

Na égua, a contração da musculatura uterina é importante para a 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 *et al.*, 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). Ocitocina foi detectada no sêmen, em extratos de testículos e epidídimos de garanhões, e em todas as frações do ejaculado do garanhão, sendo as maiores no gel (WATSON, 1999).

Por outro lado, Fiala *et al.* (2002) observaram que o plasma seminal também provoca uma reação inflamatória uterina, comparando 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. Verificou-se que as éguas que receberam o plasma tiveram uma resposta inflamatória até às 24h após a infusão, sendo o pico às 4h após a infusão. O grupo controle teve uma reação inflamatória no útero significativamente inferior ($p < 0,02$) ao outro.

4.3 Seleção Espermática

Os ejaculados dos eqüinos são significativamente caracterizados por uma grande variabilidade de parâmetros, especialmente aqueles de relevância prática para a inseminação artificial. Por isso, é de interesse prático obter sub-populações

concentradas de espermatozóides vitais e competentes do ejaculado de origem. Coletas de sêmen fracionadas de garanhões disponibilizam frações seminais de espermatozóides selecionados para utilização em uma futura preservação de sêmen (SIEME *et al.*, 1997).

A simples centrifugação, seguida de ressuspensão, não oferece a seleção dos espermatozóides de melhor qualidade do ejaculado, o qual é sabido consistir de diferentes sub-populações de espermatozóides. Todavia, procedimentos para a seleção bem sucedida de espermatozóides morfológica e funcionalmente normais têm sido desenvolvidas para uso em técnicas de reprodução assistida como a fecundação *in vitro*. (SIEME *et al.*, 2003).

A subfertilidade é comum em garanhões e técnicas são necessárias para aumentar a fertilidade desses animais. Grandes aumentos na motilidade espermática foram observados com passagem em lâ de vidro, sendo que esferas de vidro proporcionaram a melhor recuperação de espermatozóides móveis. A centrifugação é o método ideal de extração, entretanto o fluxo de gravidade é um método de extração aceitável combinado com a seleção por campos, utilizando um volume de sêmen máximo de 50 mL (CASEY *et al.*, 1993).

Os procedimentos de separação espermática são utilizados para isolar uma população ótima de células morfológicamente normais, com alta motilidade, dos componentes do plasma seminal antes do uso nos procedimentos de FIV. O gradiente de Percoll[®] remove eficientemente os componentes do plasma seminal e do diluente utilizado na criopreservação (DROBNIS *et al.*, 1991).

Gradientes de densidade separam células com diferenças na gravidade específica em diferentes camadas após centrifugação. O gradiente de gravidade descontínuo mais comumente utilizado contém partículas de sílica cobertas com polivinilpirrolidona com o nome comercial de Percoll[®]. Deposita-se uma ou mais camadas desse colóide com diferentes densidades num tubo para centrifugação do tipo Falcon. Sobre essa coluna deposita-se uma camada com as células ou partículas que se deseja separar e leva-se o tubo para centrifugação. Células/partículas com maior gravidade específica ficarão depositadas sob a forma de um *pellet* no fundo do tubo. (Percoll[®], Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Quando se trabalha com espermatozóides, o Percoll[®] seleciona espermatozóides de acordo com sua densidade, relacionada com seu estado de maturação ou integridade (DE VRIES & COLEMBRANDER, 1988; OSHIO, 1988). Os espermatozóides com uma boa morfologia nuclear são mais densos e são depositados na área de maior densidade (LE LANNOU & BLANCHARD, 1988). Além disso, os

espermatozoides móveis depositam-se mais rápido que as células imóveis com a força centrífuga devido ao alinhamento dos seus movimentos com essa força (RHEMREV *et al.*, 1989).

Gradientes descontínuos de densidade têm sido utilizados para selecionar populações de maior qualidade espermática para técnicas de reprodução assistida em humanos (MORTIMER, 2000). Turner & Arns (1998) encontraram que separação espermática através de uma coluna de Percoll[®] resultou em melhor aumento de células com motilidade progressiva (P=0,0001) imediatamente após o processamento quando comparados por separação via gradientes de arabinogalactano ou 12% BSA. A recuperação de espermatozoides também foi maior (P=0,0003).

Na espécie equina, os métodos de seleção podem ser de interesse para separação de espermatozoides tanto do plasma seminal quanto do diluente. Além disso, estes procedimentos são utilizados para enriquecer espermatozoides de qualidade superior, com respeito à morfologia e/ou motilidade. Testando diferentes técnicas para seleção espermática em sêmen fresco e congelado de garanhões, verificou-se aumento na percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e redução na percentagem de espermatozoides com anormalidades de cabeça, provavelmente não por melhorar a qualidade de células individuais, mas por eliminar os espermatozoides de qualidade inferior.

A passagem de sêmen através de uma coluna de lã de vidro - *Sefadex* (GRAHAM & GRAHAM, 1990) ou gradiente de Percoll[®] (SINGER *et al.*, 1995) melhorou a qualidade espermática segundo os autores. Pareceria lógico, então, que a inseminação de éguas com sêmen processado por esses métodos seja possível aumentar as taxas de prenhez, uma vez que se está utilizando apenas os espermatozoides de qualidade superior. Graham e Graham (1990) aumentaram significativamente as taxas de não retorno ao cio de vacas inseminadas com sêmen de touros de baixa fertilidade, filtrando o sêmen antes da inseminação. Entretanto, Nie *et al.* (2003) não encontraram aumento na fertilidade selecionando espermatozoides por lã de vidro - *Sefadex* ou Percoll[®] antes da inseminação, concluindo que a seleção espermática para inseminação intra-cornual profunda por filtração através da coluna de lã de vidro - *Sefadex* pode melhorar o resultado da prenhez usando-se um número absoluto de espermatozoides.

A seleção por gradiente de Percoll[®] separa as células espermáticas viáveis dos espermatozoides mortos e lesados, aumentando assim a qualidade e a longevidade do sêmen congelado (LEÃO, 2002). Gomes *et al.* (2003) não encontraram diferença entre

os índices de fertilidade em relação à inseminação com espermatozóides selecionados e não selecionados por gradiente de Percoll[®], quando as inseminações foram realizadas no corpo uterino. Porém, a seleção em gradiente descontínuo de Percoll[®] após o descongelamento demonstrou uma tendência em melhorar o potencial fertilizante do sêmen criopreservado.

A fertilidade de éguas inseminadas por histeroscopia com diferentes números de espermatozóides progressivos foi estudada por Morris *et al.* (2000). Os autores diluíram o sêmen com diluente à base de leite desnatado e depositaram o sêmen diluído sobre gradiente descontínuo de Percoll[®] 90:45. A suspensão espermática foi centrifugada através das camadas do Percoll[®] por 5 min a 200 g e, em seqüência, por 10 min a 800 g. Inseminando 10, 8, 25, 14, 11 e 10 éguas com, respectivamente, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 ou 0,001 x 10⁶ espermatozóides móveis resultaram em taxas de concepção de, respectivamente, 60%, 75%, 64%, 29%, 22% e 10%. Conquanto, Alvarenga & Leão (2002) não encontraram diferença na taxa de prenhez de éguas inseminadas por histeroscopia com sêmen congelado selecionado (33,3%) e não selecionado (33,3%) por gradiente de Percoll[®].

4.4 Centrifugação

A centrifugação é realizada com o objetivo de separar a fração de sêmen rica em espermatozóides do plasma seminal, e de concentrar o ejaculado. Existem vários estudos sobre a influência da centrifugação na motilidade, na morfologia e na capacidade de fertilização das células espermáticas, com resultados contraditórios. A maioria desses 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; WÖCKERNER *et al.*, 1990), a percentagem de plasma seminal retirada com a centrifugação (PICKETT *et al.*, 1975; JASKO *et al.*, 1992; KNEISSL, 1993) e o diluente utilizado na ressuspensão do sêmen, após a centrifugação, influenciam na qualidade do sêmen.

Alguns autores já descreveram o efeito negativo da centrifugação do sêmen equino sobre a motilidade espermática (MACLEOD e MACGEE, 1950). 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 500 g por 18 minutos e ressuspensa no próprio sobrenadante e outra diluída em leite desnatado-glicose e não centrifugada. As amostras foram resfriadas a +5°C por 24h. Foi notada uma queda significativa na motilidade das amostras centrifugadas na hora zero, não se observando diferença nas 24h. Em outro trabalho, Martin *et al.* (1979) testaram um diluente à base de EDTA-glicose antes da centrifugação a 1000 g por 5 minutos e observaram uma melhora na motilidade das amostras diluídas e centrifugadas, em comparação com as não diluídas e centrifugadas. Bader, em 1970, centrifugou 38 ejaculados de garanhão para comparar com os dados obtidos pelo método de coleta fracionada. Foi observado um decréscimo na motilidade do sêmen centrifugado a 500 g sem diluição prévia.

Cochran *et al.* (1984) encontraram melhor motilidade pós-congelamento em amostras pré-diluídas com EDTA-citrato e centrifugadas em recipientes contendo 0,25mL de uma solução viscosa de EDTA-glicose, que teria a função de amortecer o impacto dos espermatozoides durante o processo de centrifugação.

A motilidade de amostras centrifugadas a 370 e 829g por 5 min foi comparada por Pickett *et al.* (1975) e não foi encontrada influência negativa da centrifugação sobre a motilidade pré e pós-congelamento. Os mesmos autores, ao testarem a fertilidade de amostras de sêmen centrifugadas a 310 g e não centrifugadas, não encontraram diferença significativa na taxa de prenhez aos 50 dias. McCall (1969) concluiu que a centrifugação em baixa rotação não danificava as células espermáticas.

Testando o efeito da centrifugação sobre a integridade da membrana da célula espermática, Baumgartl (1980) comparou 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. Keller (1998), entretanto, observou melhor percentual de motilidade progressiva nas amostras centrifugadas e armazenadas a +4°C, por 24h, 48h e 72h, que em amostras não centrifugadas. A autora também verificou que a centrifugação a 1000 g provocou diminuição significativa da funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides logo após a centrifugação com EDTA-glicose.

Papa *et al.* (1981) testaram diferentes forças de centrifugação em 50 ejaculados de 5 garanhões, comparando a motilidade e a coloração supravital pós-congelamento. As amostras de sêmen foram diluídas 1:1 em EDTA e centrifugadas a 1000 g por 5 ou 10 minutos, ou a 2000 g por 2 minutos e 30 segundos ou 5 minutos. As amostras descongeladas centrifugadas apresentaram melhor motilidade total e maior percentagem de células não coradas pela eosina, não havendo diferença significativa entre as forças de centrifugação.

4.5 Avaliação do Sêmen

4.5.1 Motilidade Espermática

A avaliação da motilidade espermática consiste na determinação da percentagem de espermatozóides totais com movimento em um ejaculado. Para se obter uma avaliação mais precisa, pode-se avaliar apenas a percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva, já que a estes é atribuída alta fertilidade (PICKETT & VOSS, 1972).

Entende-se por motilidade progressiva a percentagem de células que estão se movimentando ativamente para frente. Incluem-se, também, os espermatozóides com movimentos circulares amplos, devido à alta incidência de implantações abaxiais do colo (BIELANSKI & KACZMARSKI, 1979). A motilidade total é definida como a percentagem de espermatozóides que apresentam movimento circular, pendular, progressivo ou em serpentina.

A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação de espermatozóides preservados e constitui um elemento importante na estimativa da viabilidade espermática (KENNEY *et al.*, 1983, VARNER *et al.*, 1988; PICKETT, 1993). Sendo ela um componente indispensável no mecanismo de fertilização, sua perda irreversível resultaria na perda da função celular. Por outro lado, sua manutenção não implica integridade celular completa (VARNER *et al.*, 1988) e não tem correlação absoluta com a fertilidade (PACE & SULLIVAN, 1975; BEDFORD *et al.*, 1995; MATTOS, 1995; KELLER, 1998).

Alguns métodos foram descritos para estimar objetivamente a motilidade dos espermatozóides: fotomicrografia (VAN HUFFEL *et al.*, 1985); videomicrografia (VARNER, 1991), espectrofotometria (JASKO *et al.*, 1989) e análise computadorizada

(AMANN & PICKETT, 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, 1991).

Jasko *et al.* (1992) observaram que as características seminais melhor correlacionadas ($p < 0,01$) com dados de fertilidade de garanhões Puro Sangue de Corrida e Standardbred foram a avaliação subjetiva da percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva ($r=0,46$) e móveis totais ($r=0,40$), a percentagem de espermatozóides morfológicamente normais ($r=0,36$) e a percentagem de espermatozóides progressivos estimada por análise computadorizada ($r=0,34$).

4.5.2 Morfologia Espermática

A forma do espermatozóide pode ser alterada durante vários estágios de sua vida e as causas destas deformidades podem agir num estágio específico do desenvolvimento espermático, ou ocorrer durante o transporte, após sua maturidade. As possíveis causas destas alterações podem estar presentes na espermatogênese, na maturação do gameta, durante e após a ejaculação (DOTT, 1975).

A avaliação isolada da morfologia espermática pode não indicar o potencial de fertilidade de um ejaculado, mas pode indicar se o potencial de fertilidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagens de anormalidades espermáticas de primeiro e segundo grau (DOTT, 1975).

As alterações morfológicas do espermatozóide equino podem se dividir em primárias e secundárias (Blom, 1949). As alterações primárias ocorrem durante o processo de espermatogênese e as alterações secundárias ocorrem durante o percurso pelos ductos, epidídimo e durante a ejaculação. Esta classificação tem sido questionada, pois a origem destas alterações ainda não foi bem esclarecida (Blom, 1973). Os termos utilizados para classificar as alterações de espermatozóides de bovinos foram maiores e menores, baseando-se em resultados de baixa fertilidade (Blom, 1973). Nesta espécie, os defeitos maiores incluem os de cabeça, gota proximal e peça intermediária, e significam resultados de baixa fertilidade, mas a importância dos defeitos menores sobre a fertilidade, na espécie bovina, ainda não foi bem esclarecida. As características morfológicas dos espermatozóides equinos diferem das de outras espécies, como a cabeça assimétrica com um pequeno acrossoma e a implantação abaxial da cauda (BELANSKI & KACZMARSKI, 1979).

Ao realizar um estudo com 293 garanhões Hanoverianos de 7 a 17 anos, Klug (1982) observou que, em animais com atividade sexual normal, a média de dois ejaculados foi de 50% de espermatozóides normais, e de 75% com integridade de acrossoma.

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.

A variação da composição do plasma seminal pode afetar diretamente a morfologia do espermatozóide, tornando-o mais susceptível a danos durante a manipulação e após a ejaculação. Inúmeros fatores podem afetar a espermatogênese e/ou a passagem do espermatozóide pelo epidídimo, com possíveis conseqüências na morfologia espermática. Entre estes fatores estão condições de aumento da temperatura local, aumento elevado da temperatura corporal e ação de alguns fármacos (COWART, 1979).

4.5.3 Teste de Funcionalidade de Membrana - Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico (HOST) 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 de forma seletiva (DREVIUS & ERIKSSON, 1966; DREVIUS, 1972), as quais provocam um aumento de volume ou “edemaciamento” do espermatozóide, particularmente visível na cauda. Assim, a capacidade de a cauda espermática enrolar na presença de solução hiposmótica demonstra que está ocorrendo transporte de água através da membrana, indicando função intacta da membrana (DREVIUS & ERIKSSON, 1966). 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 em hamsters.

O estudo da funcionalidade da membrana é de grande importância, tendo sido relatadas correlações positivas entre a percentagem de enrolamento de cauda em espermatozóides e motilidade em sêmen humano (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 de sua 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 tem influência na preservação do sêmen (LAGARES, 1995; KOHNE *et al.*, 1995).

Keller (1998) utilizou o teste hiposmótico para determinar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozóides eqüinos, comparando a funcionalidade da membrana de espermatozóides 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. Observaram altos percentuais de espermatozóides 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 da membrana durante as 72 horas de armazenamento a + 5°C, em relação aos outros diluentes utilizados.

O teste hiposmótico também foi utilizado por Vieira *et al.* (2002) para avaliar a funcionalidade da membrana de espermatozóides eqüinos diluídos em leite desnatado (LD), acrescido de diversos antimicrobianos. Os autores observaram perda significativa de funcionalidade de membrana nos espermatozóides diluídos em LD acrescido de 1000 mg/mL de gentamicina e nos espermatozóides 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.

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

Testes com coloração fluorescente têm sido desenvolvidos para avaliar a integridade da membrana plasmática por microscopia. 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).

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). 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).

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).

4.6 Resfriamento do Sêmen

A taxa de resfriamento tem fundamental importância na preservação espermática, sendo que taxas de resfriamento menores minimizam o choque térmico (AMANN & GRAHAM, 1993).

Quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, mais lenta deve ser a taxa de resfriamento, pois esta determina a sobrevivência espermática (PICKETT, 1993). Curvas rápidas de resfriamento podem causar danos irreversíveis aos espermatozoides (WATSON, 1981). Douglas – Hamilton *et al.* (1984) concluíram que o resfriamento rápido ($>1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) produziu mais efeitos deletérios sobre a motilidade e integridade espermáticas, em relação ao resfriamento lento ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Curvas apropriadas de resfriamento podem permitir o armazenamento de espermatozoides por um longo

período (MATTOS, 1995; MEIRELLES *et al.*, 1998; Lagares *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2001).

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°C a +5°C, com uma taxa linear de 1°C/min, e verificaram que a motilidade progressiva foi semelhante à das amostras resfriadas a 0,5 ou 0,21°C/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°C/min sobre a manutenção da motilidade. Concluíram que o sêmen eqüino pode ser resfriado rapidamente de +37°C até +20°C, e que, a partir deste ponto, a velocidade de resfriamento deve ser menor que 0,1°C/min, sendo 0,05°C/min a ideal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 10 ejaculados de quatro garanhões, sendo dois da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e dois de dois centros criatórios de Porto Alegre-RS. Dois animais foram considerados de alta qualidade, e dois de baixa qualidade. Tal classificação teve como base os dados da motilidade apresentada pelos 40 ejaculados principalmente nas 0 e 24 horas, sendo considerados de baixa fertilidade aqueles cujo ejaculado, nas primeiras 24h, apresentava uma queda acentuada na percentagem de espermatozóides móveis, principalmente os progressivos.

5.1.1 Preparação do plasma seminal

Cada *pool* de plasma seminal era constituído de alíquotas de dois diferentes animais de cada categoria. Portanto, o *pool* de plasma seminal de alta fertilidade era composto de uma mistura entre os plasmas seminais dos garanhões de alta fertilidade e o *pool* de baixa fertilidade era composto de uma mistura entre plasmas seminais de garanhões de baixa fertilidade. Os plasmas seminais utilizados foram obtidos por centrifugação de ejaculados de cada garanhão utilizado no experimento. O plasma seminal era retirado dos tubos utilizados para a centrifugação e colocado em tubos próprios para congelamento, tendo o *pellet* sido desprezado. Esses tubos com o plasma seminal foram mantidos congelados a -196°C durante a fase experimental do trabalho, sendo descongelados em banho-maria a $+37^{\circ}\text{C}$ para uso sempre que uma nova coleta de sêmen era realizada e, depois de utilizado, era descartado.

Foi utilizada a concentração 5% de plasma seminal durante o experimento. Para a composição do *pool*, 37,5 μl de cada plasma seminal eram adicionados a 1,425 mL de diluente. Na amostra onde o plasma seminal homólogo era utilizado, 75 μl do referido plasma foi adicionado em 1,425 mL de leite UHT desnatado.

5.2 Formação do Gradiente de Percoll

O gradiente de Percoll^{®1} foi preparado com o meio de Tyrode modificado (Sperm-TALP) cuja composição está descrita no apêndice A.

Para a preparação do gradiente, são necessárias duas soluções. A primeira deve ser 10 vezes mais concentrada e a segunda da maneira normal. Para montagem do gradiente foram utilizados 0,9 mL de Sperm TALP 10x adicionados a 8,1 mL de Percoll[®], resultando em 9 mL de Percoll[®] 90%. Para preparar o Percoll[®] 45%, utilizaram-se 3 mL do Perc¹oll[®] 90% já preparado, diluídos com 3 mL de Sperm TALP 1x, resultando em 6 mL de Percoll[®] 45%.

Em tubos plásticos cônicos de 15mL do tipo Falcon foi depositado 1mL do Percoll[®] 45%. Com auxílio de seringa e agulha, a solução 90% foi cuidadosamente depositada sob a primeira, evitando que se misturassem. Foram preparados 4 tubos antes de cada coleta. O gradiente já formado ficava em banho-maria a 37°C até o uso.

5.3 Coleta de Sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas através de vagina artificial modelo Hannover (GÖTZE, 1949), tendo sido utilizado um segundo tubo descartável de polietileno além do tubo interno de látex. Esse tubo plástico era lubrificado com vaselina estéril e tinha um copo coletor estéril acoplado. A vagina artificial era preenchida com água quente de forma que sua temperatura interna ficasse entre +42°C e +45°C. Para a realização das coletas utilizou-se como manequim uma égua em cio devidamente contida com peias e com sua cauda protegida por atadura. No momento da monta do garanhão, o pênis ereto foi desviado na 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).

¹ .Percoll[®], Sigma Aldrich, St. Louis, MO

5.4 Exame do Sêmen

5.4.1 Exame microscópico do sêmen

Inicialmente, realizaram-se a avaliação e o registro do aspecto do ejaculado, que foi avaliado quanto à consistência (aquoso, seroso, leitoso ou cremoso) e coloração (branco acinzentado ou branco amarelado). Em seguida, a fração gel, quando existente, foi separada com auxílio de uma pipeta de Pasteur e a porção rica do sêmen filtrada através de uma gaze estéril. O volume do ejaculado foi determinado em proveta.

5.4.2 Motilidade espermática

A motilidade progressiva e a motilidade total dos espermatozóides foram registradas logo após a filtragem do ejaculado. Uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula, ambas pré-aquecidas a $+37^{\circ}\text{C}$ em mesa térmica. A amostra foi observada em microscopia de contraste de fase em 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 percentagem de espermatozóides que se movimentavam ativamente para frente e em círculos amplos. Considerou-se como motilidade total a percentagem de células espermáticas que apresentavam movimento.

Para reduzir os erros de observação, no mínimo duas lâminas foram examinadas por amostra, sendo observados, no mínimo, cinco campos em cada.

5.4.3 Determinação da concentração espermática

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

5.4.4 Teste de integridade de membrana (CFDA/PI)

Esse teste foi realizado colocando-se 100 µl de sêmen, 1 µl de iodeto de propídio (PI), 1 µl de carboxifluoresceína (CFDA) e 1 µl de formol-citrato em um pequeno frasco previamente protegido externamente por papel alumínio para evitar contato com a luz (Kneissl, 1993). 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 incubadas em banho-maria a +37°C por oito minutos. Após este período, foi colocada uma gota entre lâmina e lamínula, que foi analisada em microscopia de fluorescência em aumento de 1000x, utilizando-se óleo de imersão. Foram avaliadas 100 células por amostra, sendo consideradas como possuindo membrana íntegra aquelas que coraram de verde. As células coradas de vermelho foram consideradas como possuindo membrana danificada.

5.4.5 Teste de funcionalidade de membrana – teste hiposmótico

Para a avaliação da funcionalidade de membrana foi utilizado o teste hiposmótico (HOST). Na realização deste teste, 200 µl de água destilada e 100 µl de sêmen foram utilizados, seguindo a técnica de Lomeo & Giambersio (1991), modificada por Lagares *et al.* (1998), perfazendo uma osmolaridade de 100mOsmol/kg. Este teste foi aplicado às amostras de sêmen em todos os tempos de observação. As amostras foram colocadas em banho-maria a +37°C por oito 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 consideradas como possuindo membrana funcional aquelas células que aumentaram de volume, apresentando enrolamento de cauda.

5.5 Diluentes

Dois diluentes foram utilizados durante a realização do experimento.

5.5.1 EDTA-Glicose

O diluente EDTA-Glicose (Merck I^{®2}) foi utilizado para diluir o sêmen no processo de centrifugação para seleção por gradiente de Percoll[®]. O diluente foi preparado conforme orientações do fabricante e dividido em tubos esterilizados de 10 mL e congelado a -20°C .

5.5.2 Leite desnatado

O diluente leite desnatado UHT³ 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°C .

5.6 Resfriamento do Sêmen

As amostras de sêmen diluídas foram resfriadas em EquitainerTM até $+4^{\circ}\text{C}$ 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 de vidro de 5 mL previamente esterilizados. Após as primeiras 24 horas, as amostras foram mantidas em estufa a $+4^{\circ}\text{C}$ e permaneceram resfriadas por 72 horas. Cada frasco continha um volume de, aproximadamente, 2 mL.

² Merck 1- Minitüb Abfull- und Labortechnik GmbH & CO- Kg Germany

³ Leite UHT Elegê –Elegê Alimentos Brasil

6 EXPERIMENTOS

6.1 Experimento 1

Avaliação do número de espermatozóides recuperados após seleção por gradiente de Percoll[®] em diferentes protocolos de centrifugação.

6.1.1 Animais

Foi utilizado um garanhão da raça puro sangue de corrida de 6 anos de idade, comprovadamente fértil. O equino estava alojado na Faculdade de Veterinária da UFRGS, sendo mantido solto em piquetes durante todo o dia. Sua alimentação consistia em aveia e feno.

6.1.2 Diluentes

Foi utilizado somente Leite desnatado UHT para diluição pré-seleção e para ressuspensão do *pellet* de espermatozóides recuperados.

6.1.3 Delineamento Experimental

Foram realizadas 5 coletas de sêmen. Imediatamente após a coleta por vagina artificial, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade, vigor e concentração. Foram retiradas duas amostras de 4 mL, diluídas em leite UHT com concentrações de 50 e 100 x 10⁶ espermatozóides por mL, respectivamente. Após a diluição o sêmen foi novamente avaliado para os parâmetros de motilidade. Cada uma destas amostras foi dividida em 4 alíquotas de 1 mL, que foram então colocadas sobre gradiente descontínuo de Percoll[®] 45/90 (3.2) e submetidas a diferentes tempos e velocidades de centrifugação.

V1 200 g (5 min) + 800 g (10 min)

V2 800 g (10 min)

V3 800 g (15 min)

V4 800 g (20 min)

Após este processo, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de cada alíquota ressuspensionado com 0,5 mL de leite UHT. As 8 amostras foram novamente avaliadas quanto à concentração, motilidade e vigor.

6.1.4 Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizada análise de variância em um delineamento completamente casualizado. Foram considerados como efeitos fixos a concentração espermática e o protocolo de centrifugação. Para o teste de complementação de médias foi utilizado o teste de Tukey considerando-se 5% como significativo.

6.1.5 Resultados

Os ejaculados utilizados neste experimento tiveram como valores médios de volume $36 \pm 10,2$ mL (34 a 48 mL), motilidade total $82 \pm 2,7\%$ (80 a 85%) e progressiva $31 \pm 14,3\%$ (15 a 50%). As concentrações dos ejaculados variaram entre 152×10^6 e 335×10^6 , com média de $247,4 \pm 67,1 \times 10^6$ espermatozóides por mL.

Na Tabela 1 estão representados os valores médios e desvios-padrão de motilidade total (%) das duas concentrações espermáticas testadas, selecionadas por gradiente de Percoll com diferentes tempos e forças de centrifugação. Não houve influência dos protocolos de centrifugação ($p=0,984$), da concentração espermática ($p=0,854$), nem interação entre protocolo de centrifugação e número total de espermatozóides ($p=1,000$) na motilidade total dos espermatozóides selecionados por gradiente de Percoll (Apêndice B).

Tabela 1- Valores médios (%) e desvio-padrão da motilidade total das duas amostras de diferentes concentrações, após seleção por gradiente de Percoll, nos diferentes protocolos de centrifugação

Concentração	V1	V2	V3	V4
50×10^6	$93 \pm 2,74$	$94 \pm 2,23$	$93 \pm 2,74$	$93 \pm 2,74$
100×10^6	$93 \pm 2,74$	$93 \pm 3,21$	$92 \pm 2,51$	$92 \pm 2,51$

V1 200 g /5 min + 800 g /10 min, V2 800 g /10 min, V3 800 g /15 min, V4 800 g /20 min.

Os valores médios e desvios-padrão de motilidade progressiva (%) das duas concentrações espermáticas testadas selecionados por gradiente de Percoll com diferentes tempos e forças de centrifugação estão expressos na Tabela 2. Não houve influência dos protocolos de centrifugação ($p=0,947$), da concentração espermática ($p=0,817$) nem interação entre protocolo de centrifugação e número total de

espermatozóides ($p=0,997$) na motilidade total dos espermatozóides selecionados por gradiente de Percoll (Apêndice C).

Tabela 2 - Valores médios (%) e desvio-padrão da motilidade progressiva das duas amostras de diferentes concentrações, após seleção por gradiente de Percoll, nos diferentes protocolos de centrifugação

Concentração	V1	V2	V3	V4
50×10^6	$83 \pm 7,58$	$83 \pm 7,58$	$79 \pm 11,4$	$80 \pm 9,35$
100×10^6	$83 \pm 10,37$	$83 \pm 8,36$	$81 \pm 9,62$	$82 \pm 9,74$

V1 200 g /5 min + 800 g /10 min, V2 800 g /10 min, V3 800 g /15 min, V4 800 g /20 min.

O percentual de espermatozóides recuperados após seleção por gradiente de Percoll de duas concentrações espermáticas com diferentes tempos e forças de centrifugação encontra-se demonstrado na Tabela 3. Não se verificou influência da concentração ($p=0,3951$) no percentual de espermatozóides recuperados. Entretanto, observou-se influência do tipo de protocolo utilizado. O percentual de células recuperadas foi significativamente superior nas amostras que foram submetidas a V4 (800 g/20 minutos) em relação a V1 ($p=0,0003$), V2 ($p=0,0003$) e V3 ($p=0,001$). Não se observou interação entre tratamento e concentração espermática ($p=0,301$).

Tabela 3 - Valores médios (%) e desvio-padrão dos percentuais de espermatozóides recuperados das duas amostras de diferentes concentrações, após seleção por gradiente de Percoll, nos diferentes protocolos de centrifugação

Concentração	V1	V2	V3	V4
50×10^6	$36,6 \pm 18^a$	24 ± 8^a	$31,8 \pm 16^a$	$57,2 \pm 24^b$
100×10^6	$22,4 \pm 15^a$	$28,6 \pm 17^a$	$26,5 \pm 11^a$	51 ± 30^b

(a, b – $p < 0,001$) letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas.

V1 200 g /5 min + 800 g /10 min, V2 800 g /10 min, V3 800 g /15 min, V4 800 g /20 min.

6.2 Experimento 2

Adição de Plasma Seminal de diferentes qualidades em sêmen equino selecionado por gradiente de Percoll e resfriado a +4°C por até 72 horas.

6.2.1 Animais

Foram utilizados 4 garanhões alojados na Faculdade de Veterinária da UFRGS, 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). Os animais tinham entre 6 e 25 anos, eram mantidos durante o dia soltos em piquetes e estabulados durante a noite. A alimentação era à base de aveia, ração comercial e feno.

6.2.2 Diluentes

Dois diluentes foram utilizados durante a realização do experimento. O diluente EDTA-Glicose (Merck I[®]) foi utilizado para a diluição do sêmen na centrifugação para seleção por gradiente de Percoll[®]. O diluente leite desnatado UHT foi utilizado para a ressuspensão do *pellet* e armazenamento das amostras a +4°C

6.2.3 Delineamento experimental

Após a determinação da concentração do ejaculado, foram preparadas cinco frações de 100×10^6 espermatozoides diluídas 1:1 (v/v) em EDTA-Glicose. Quatro destas frações, contendo entre 1mL e 2mL, foram cuidadosamente depositadas sobre o gradiente de Percoll[®] 45/90. A fração restante, de mesmo volume, foi centrifugada em tubo de ensaio, sob as mesmas condições de tempo e velocidade das demais amostras.

Foi realizada centrifugação por 5 minutos em 200 g seguida de 10 minutos em 800 g (MORRIS *et al.*, 2000). Após esse processo, o sobrenadante foi descartado por pipeta de aspiração e o *pellet* ressuspendido com leite UHT desnatado compondo os seguintes tratamentos:

Sp: 1,5 mL de leite UHT desnatado sem adição de plasma seminal.

Hp: 1,425 mL de leite UHT desnatado acrescido de 75 μ L de plasma seminal homólogo.

Ap: 1,425 mL de leite UHT desnatado acrescido de 75 μ L de plasma seminal do *pool* de alta qualidade.

Bp: 1,425 mL de leite UHT desnatado acrescido de 75 μ L plasma seminal do *pool* de baixa qualidade.

Cc: foi centrifugada sem sofrer processo de seleção por gradiente de Percoll[®] e teve seu sobrenadante, composto de plasma seminal e diluente de centrifugação, descartado e foi ressuspensa com 2 mL de leite UHT.

C: uma amostra de sêmen diluído em leite UHT foi mantida como controle no processo de armazenamento. A concentração espermática dessa amostra variou entre 30 e 40 x 10⁶ células por mL.

6.2.4 Análise Estatística

Foi utilizado um modelo em parcela subdividida, considerando-se como parcelas principais os tratamentos e como subparcelas as horas e a interação horas versus tratamento. Como variáveis dependentes foram utilizadas a motilidade total e a progressiva, o vigor, a funcionalidade e a integridade de membrana. Para fins de análise da motilidade progressiva e da funcionalidade de membrana utilizou-se a variável transformada pela raiz quadrada (valor+10), por ser a variância heterogênea e distribuição assimétrica. As demais variáveis foram analisadas pelos valores originais. Como erro foi considerada a interação tratamento versus equino. Na comparação entre médias foi utilizado o teste de Tukey. Programa utilizado SAS versão 6.12.

6.2.5 Resultados

Os ejaculados utilizados neste experimento apresentaram um volume médio de 31,4 \pm 20,4 mL (10 a 72 mL), motilidade total de 75,8 \pm 9,4% (50 a 90%) e motilidade progressiva de 28,5 \pm 10,0% (5 a 80%). A concentração média foi de 245,1 \pm 122,4 x 10⁶ espermatozoides por mL ejaculados e variou entre 86 e 529 x 10⁶. A percentagem de

espermatozoides corados pela eosina foi de $26,4 \pm 11,3\%$ de células e variou entre 10 e 57.

A concentração estimada de plasma seminal nas amostras Cc variou entre 1,5 e 2%, enquanto que no grupo controle variou entre 16,5 e 20,3%.

Na tabela do apêndice E estão representados os valores médios e desvios-padrão de motilidade total (%), nos diversos tempos de armazenamento, das amostras de sêmen resfriadas e submetidas aos diferentes tratamentos. Foram encontradas diferenças significativas entre tempo de armazenamento ($p=0,0001$) e tratamentos ($p=0,0001$). Entretanto, não foi observada interação entre tratamento e tempo de armazenamento ($p=0,1302$). As amostras selecionadas por gradiente de Percoll (Ap, Bp, Sp, Hp) não apresentaram diferença entre si para motilidade total ($p>0,1663$). Os grupos Controle (C) e Controle centrifugado (Cc) não apresentaram diferença significativa entre eles ($p=0,0616$).

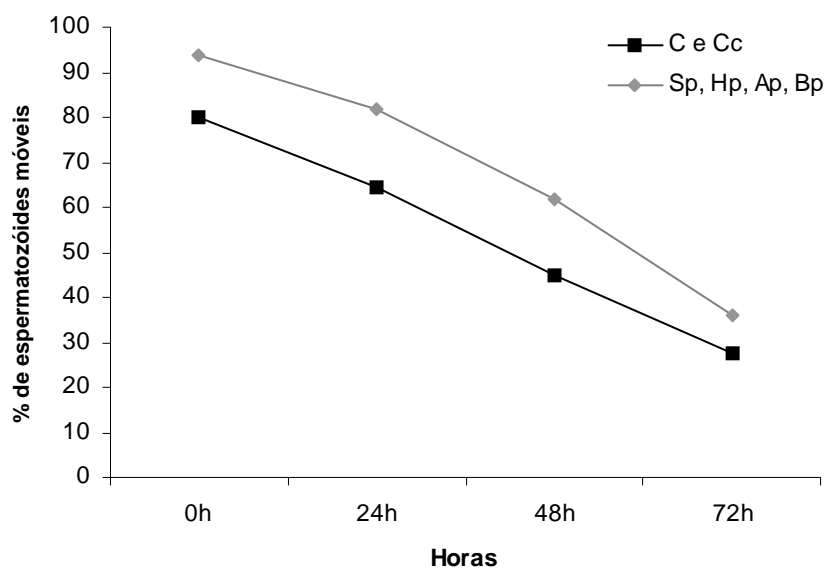


Figura 1 - Gráfico dos valores médios e desvios-padrão de motilidade total de sêmen equino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a $+4^{\circ}\text{C}$, nos diferentes tempos de observação

Os valores médios de motilidade progressiva das amostras de sêmen resfriadas e submetidas aos diferentes tratamentos nos diferentes tempos de observação estão representados na tabela do apêndice F. Foram encontradas diferenças significativas para tratamento ($p=0,0001$), entretanto, o tempo de armazenamento influenciou a motilidade progressiva ($p=0,0001$), havendo interação entre tratamentos e tempos de armazenamento.

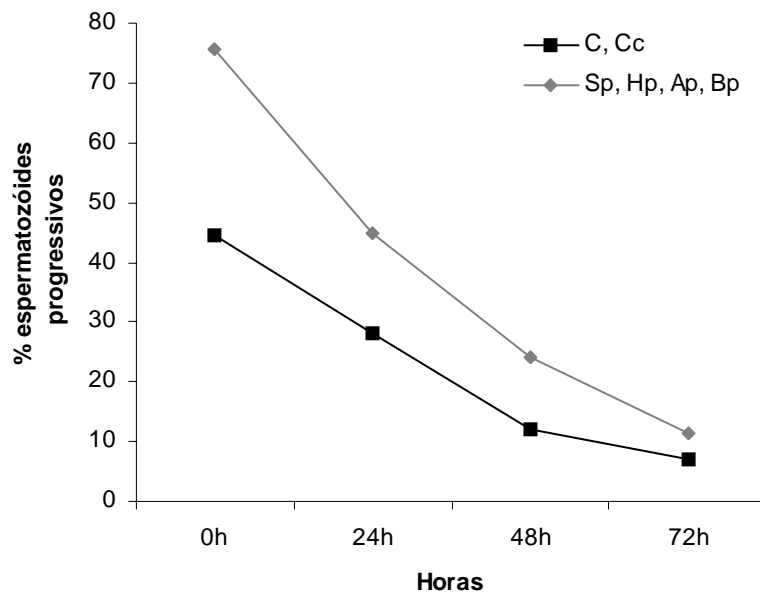


Figura 2: Gráfico dos valores médios de motilidade progressiva de sêmen equino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a $+4^{\circ}\text{C}$, nos diferentes tempos de observação

Não foi encontrada diferença significativa, para motilidade progressiva, entre os grupos selecionados por gradiente de Percoll (Ap, Bp, Sp, Hp) em nenhum dos tempos de observação (0, 24, 48 e 72 horas). O controle (C) e o controle centrifugado (Cc) não apresentaram diferença em todos os tempos de observação.

As porcentagens de espermatozoides progressivos de Ap, Sp, Hp e Bp foram significativamente maiores do que as do controle (C) nas 0, 24, 48 e 72 horas. Os grupos Ap e Sp obtiveram maiores valores que Cc nas 0, 24 e 48 horas, equiparando suas médias de motilidade progressiva nas 72 horas ($p=0,9359$), enquanto Hp e Bp obtiveram maiores valores de motilidade progressiva quando comparado a Cc apenas nas 0 e 24 horas.

A tabela do apêndice G contém os dados referentes aos valores de vigor espermático das amostras submetidas aos diferentes tratamentos. Verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,0001$) e no tempo de armazenamento ($p=0,0001$). Entretanto, não se verificaram interações entre tratamento e tempo de armazenamento ($p=0,3866$).

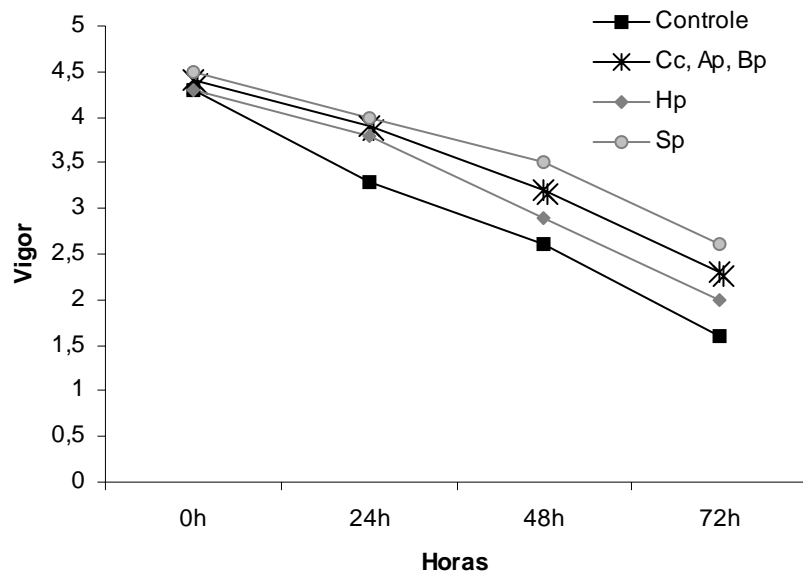


Figura 3 - Gráfico dos valores médios de vigor de sêmen equino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

O vigor espermático das amostras do grupo controle (C) foi significativamente inferior aos demais ($p < 0,0165$). As alíquotas do grupo Cc apresentaram valores de vigor semelhantes aos espermatozóides selecionados por gradiente de Percoll (Ap, Bp, Hp, Sp) ($p > 0,5553$). O vigor apresentado pelas células das amostras sem plasma seminal (Sp) foi significativamente maior que o do grupo Hp ($p < 0,0389$).

Os resultados verificados após a realização do teste hiposmótico estão sumarizados na tabela do apêndice H. Verificou-se que a funcionalidade da membrana variou significativamente por influência dos tratamentos ($p = 0,0001$) e do tempo de armazenamento ($p = 0,0001$). Entretanto, os tratamentos não foram influenciados pelo tempo de armazenamento ($p = 0,1840$).

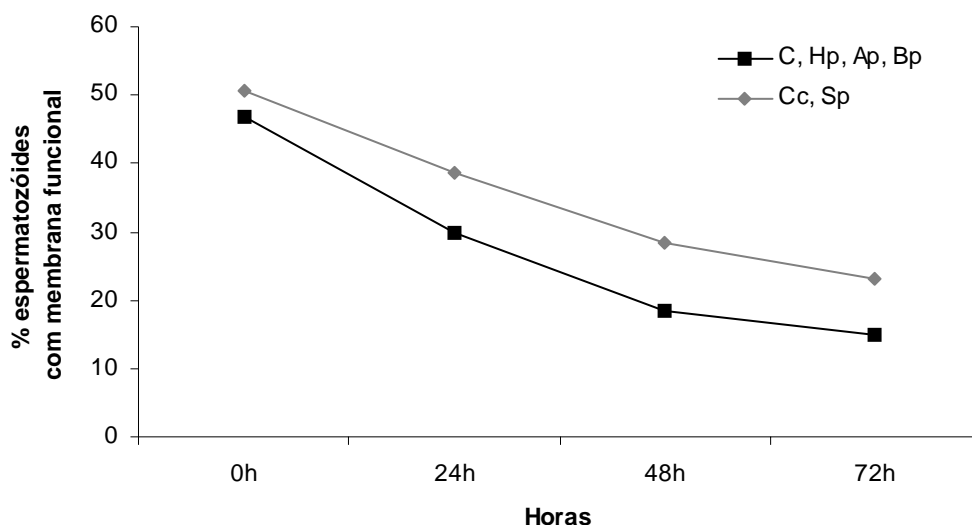


Figura 4 - Gráfico dos valores médios e desvios-padrão de espermatozoides eqüinos com membrana plasmática funcional, após diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

Os grupos Ap, Hp e Bp e Controle não apresentaram diferença significativa para percentagem de células com integridade funcional da membrana plasmática ($p > 0,1560$) durante todo o tempo de armazenamento. Entretanto, apresentaram percentual de células funcionais inferior ao observado nos grupos Cc e Sp ($p < 0,018$). O controle centrifugado (Cc) e o grupo Sp não mostraram diferença estatística entre si ($p = 0,5714$).

A tabela do apêndice I contém os dados referentes aos valores de membrana íntegra das amostras submetidas aos diferentes tratamentos. Verificou-se influência significativa entre os tratamentos ($p = 0,0001$) e no tempo de armazenamento ($p = 0,0001$). Entretanto, não se verificou interação entre tratamento e tempo de armazenamento ($p = 0,6665$).

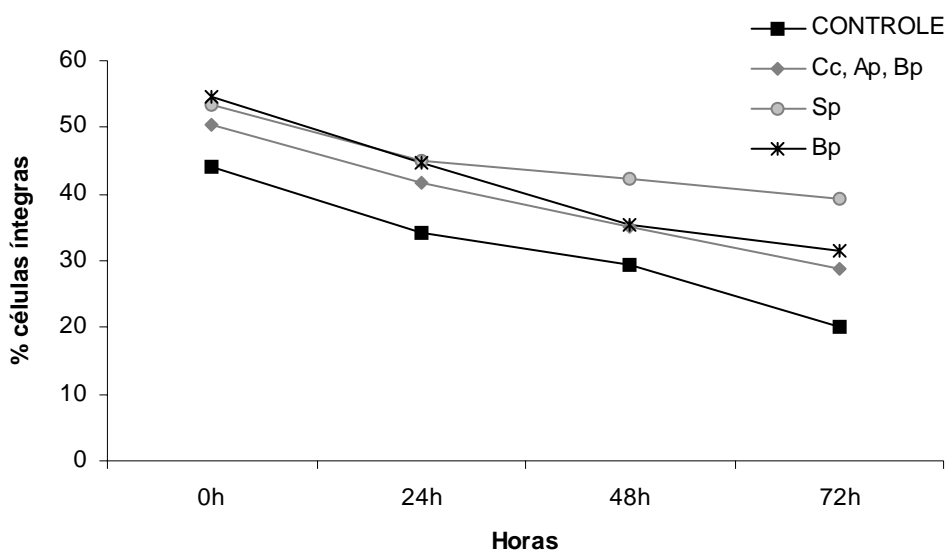


Figura 5 – Gráfico dos valores médios de espermatozoides equinos com membrana plasmática íntegra, submetidos a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

As amostras do grupo controle (C) apresentaram percentagem de células com membrana íntegra significativamente menor que todos os demais grupos ($p < 0,0034$). As amostras do tratamento Sp resultaram em maior percentagem de células com membrana íntegra que as dos grupos Ap, Hp e Cc ($p < 0,080$). Não se observaram diferenças significativas no percentual de membranas íntegras nos espermatozoides dos grupos Sp e Bp ($p = 0,1032$).

A percentagem de espermatozoides submetidos a diferentes tratamentos, com membrana acrossomal íntegra, resfriados a +4°C durante todo o tempo de armazenamento, encontra-se expressa na tabela do apêndice J. A integridade do acrossoma foi influenciada pelos tratamentos ($p = 0,0001$) e pelo tempo de armazenamento ($p = 0,0001$). Entretanto, não foram observadas interações entre tratamentos e tempo de armazenamento ($p = 0,7608$).

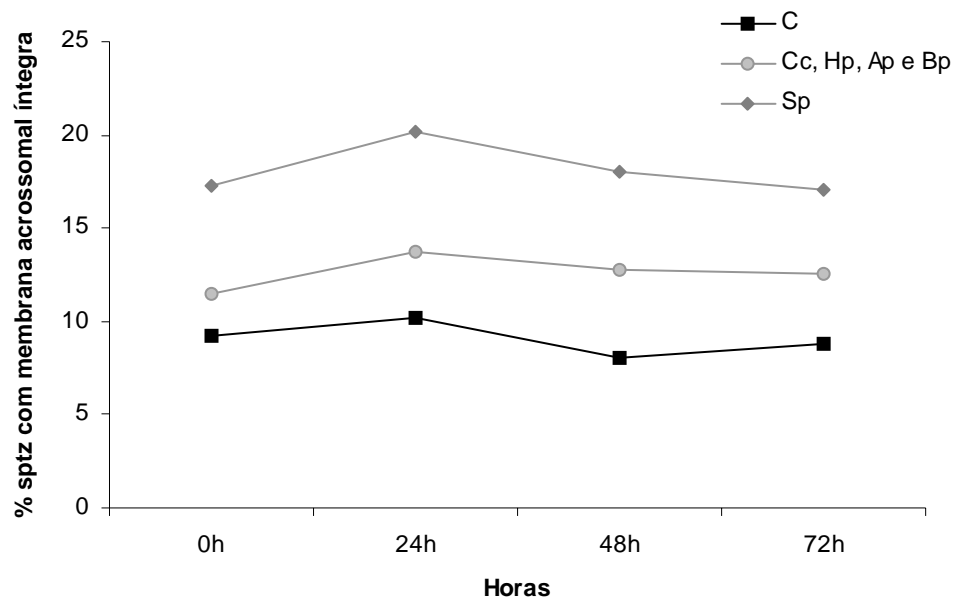


Figura 6 - Gráfico dos valores médios de espermatozoides equinos com membrana acrossomal íntegra, submetidos a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

As amostras do grupo controle (C) apresentaram percentagem de células com membrana acrossomal íntegra significativamente menor que todos os demais grupos ($p < 0,0002$). As amostras do tratamento Sp resultaram em maior percentagem de células com membrana acrossomal íntegra que as dos grupos Ap, Bp e Hp e Cc ($p = 0,0001$).

7 DISCUSSÃO

A concentração de espermatozóides, colocados sobre o gradiente de Percoll[®] descontínuo 45/90%, não influenciou o percentual de recuperação dos espermatozóides selecionados em nenhum dos protocolos de centrifugação utilizados, tampouco os percentuais de motilidade total e progressiva dos espermatozóides selecionados.

A recuperação de espermatozóides selecionados foi maior ao se utilizar o protocolo 800 g por 20 minutos, quando comparado aos demais tratamentos. Os resultados de Sieme *et al.* (2003) com uma única camada de Percoll[®] 80%, com centrifugação a 400 g por 30 minutos, demonstram percentuais de recuperação (52,5%) semelhantes aos obtidos com o protocolo 800g 20 minutos (51 a 57%), porém os espermatozóides selecionados apresentaram índice de alterações de cabeça semelhantes aos do controle. Provavelmente, o longo tempo de centrifugação poderia ter causado maiores danos às membranas das células espermáticas, apesar de isto não ter sido avaliado neste experimento. Por isto, o protocolo de escolha para o experimento 2 foi o já testado por Morris *et al.* (2000).

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), Vieira *et al.* (2002) e Schmitt (2002), que obtiveram motilidades similares às do grupo controle do presente experimento. No entanto, não se obtiveram resultados como os de Van der Holst (1984) os de Varner *et al.* (1988) e, que relatam a manutenção da viabilidade espermática por até 120h. Mesmo utilizando taxas elevadas de resfriamento (1,0°C/min), Varner *et al.* (1988) obtiveram 8% de motilidade progressiva e 12% de motilidade total após 120h a +5°C. Características espermáticas individuais dos ganhões utilizados por Verner, como alta sobrevida, resistência ao choque térmico e adaptação dos espermatozóides 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 no presente experimento, com os 8 por Mattos (1995), com os 6 por Keller *et al.* (2001) e com os 6 por Vieira *et al.* (2002) reforça esta possibilidade.

Outro fator importante na manutenção da motilidade espermática, verificado no presente experimento, foi a utilização de uma concentração que maximiza a sobrevida espermática *in vitro* (VARNER *et al.*, 1987). Utilizou-se uma concentração final de 40 a 50x10⁶ espermatozóides/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).

A seleção por gradiente descontínuo de Percoll[®] 90/45% mostrou-se efetiva na recuperação de espermatozóides com motilidades progressiva e total. As amostras submetidas à seleção por Percoll[®] apresentaram motilidade superior ao controle e ao controle centrifugado. A adição de 5% de plasma seminal (Ap, Bp e Hp) ou a ausência de plasma (Sp) não influenciaram os valores da motilidade das amostras selecionadas por gradiente de Percoll[®]. Os resultados obtidos estão de acordo com os relatados por Schmitt (2002), que não observou diferenças entre amostras contendo 0%, 2,5%, 5% e 10% de plasma seminal. Entretanto, não coincidem com os achados de 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. Da mesma forma, não concordam com os verificados por Keller *et al.* (2001) que observaram melhores resultados de motilidade total e progressiva nas amostras contendo 1,95% de plasma seminal, em comparação com as amostras contendo 17,78%.

As amostras de sêmen com menor presença de plasma seminal, dos grupos Sp e Cc, apresentaram os melhores resultados de funcionalidade de membrana. Portanto, a utilização de seleção por meio de Percoll 95/45% não influenciou na percentagem de células com membrana plasmática funcional. Observou-se, no entanto, que concentrações superiores a 2% de plasma seminal resultaram em decréscimo do número de células com membrana funcional, ao teste hiposmótico. Estes resultados contrastam com os obtidos por Schmitt (2002) em equinos, que não observou diferenças na funcionalidade de membrana em amostras contendo de 0 a 10% de plasma seminal. Da mesma forma, discordam dos achados de Vijatrasil *et al.* (1995), em que espermatozóides humanos selecionados por gradiente de Percoll[®] apresentavam percentagem significativamente maior de células com membrana funcional que o ejaculado inicial. Por outro lado, Bollendorf (1994) encontrou que a seleção por mini-Percoll foi menos efetiva em separar espermatozóides humanos com membrana funcional que as técnicas de *swim-up* e Sephadex[®], mas oferecem melhores resultados que com o controle.

Nos tratamentos com centrifugação (Cc, Sp, Hp, Ap e Bp) houve maior número de células espermáticas com membrana plasmática e acrossomal íntegras. Porém, o plasma seminal influenciou as variáveis avaliadas. As amostras sem plasma seminal (Sp) apresentaram os melhores resultados, enquanto que os piores foram observados no grupo controle, que apresentava a maior percentagem de plasma. A utilização de Percoll[®] não separou células com alteração de membrana. Entretanto, Suzuki *et al.* (2003) após utilizar em gradiente de Percoll[®] 45/90%, com centrifugação de 700 g por 15 minutos recuperaram células com maior viabilidade e integridade de membrana, bem como com maior motilidade progressiva e total que as do grupo controle.

A percentagem de células com integridade completa de membranas foi significativamente maior nas amostras que sofreram processo de centrifugação, independentemente da seleção, contrastando com os dados de Keller (2001), onde o processo de centrifugação foi prejudicial à integridade de membrana. Entretanto, Papa *et al.* (2001) não observaram efeito negativo sobre a qualidade dos espermatozóides, tanto na motilidade quanto na coloração supravital. Aparentemente, a integridade da membrana plasmática foi influenciada, pela redução da percentagem de plasma seminal, obtida pelos processos de centrifugação e seleção, resultando em maior quantidade de células completamente íntegras, o que novamente indica um efeito deletério do mesmo. Entretanto, estas alterações não são observadas na funcionalidade de membrana.

O Percoll[®] é um colóide formado de partículas de sílica cobertas com polivinilpirrolidona, que selecionam espermatozóides de acordo com a densidade, relacionada com seu estado de maturação ou integridade da célula (DE VRIES & COLEMBRANDER, 1988; OSHIO, 1988). Isso pode explicar o fato de o gradiente de Percoll[®] não ser efetivo na seleção de células espermáticas com problemas de funcionalidade e de integridade de membrana, uma vez que essas células não necessariamente apresentem perdas físicas em sua estrutura. Os espermatozóides com uma boa morfologia nuclear são mais densos e são depositados na área de maior densidade (LE LANNOU & BLANCHARD, 1988).

No presente trabalho, não se observou melhora na motilidade total e progressiva nos ganhões de baixa qualidade de sêmen quando se adicionou plasma seminal de ganhões de alta qualidade, ao contrário do observado por Vianna *et al.* (2002) e por Schmitt (2002). Da mesma forma, a adição de plasma de alta qualidade não influenciou a integridade e a funcionalidade de membrana, concordando com os achados de Schmitt (2002). Provavelmente, a inexistência de melhora na motilidade, das amostras de baixa

qualidade, em que foi acrescentado plasma de alta qualidade, deva-se à seleção prévia por gradiente de Percoll[®]. Este permite a passagem de espermatozóides móveis por se alinharem por meio de seus movimentos favoravelmente à força centrífuga (RHEMREV *et al.*, 1989). Quando se adicionou plasma de alta qualidade, adicionaram-se proteínas benéficas à motilidade (SCHMITT, 2002), que permitiriam um melhor transporte de substratos metabólicos e forneceriam uma maior fonte energética para as células espermáticas, melhorando a motilidade. Entretanto, mais de 90% das células selecionadas pelo Percoll[®] apresentavam motilidade, o que não permitiu verificar possíveis diferenças existentes.

Esses resultados não são interessantes no uso rotineiro de sêmen fresco ou resfriado, tendo, possivelmente, maior sucesso em sêmen congelado, onde há um menor número de espermatozóides móveis e um grande número de células mortas.

8 CONCLUSÕES

Concluiu-se que

- o processo de seleção por gradiente de Percoll[®] foi efetivo na recuperação de espermatozóides de equino com motilidade progressiva, entretanto não selecionou espermatozóides quanto à funcionalidade, nem à integridade de membrana;

- concentrações inferiores a 2% de plasma seminal melhoram a funcionalidade da membrana;

- a ausência de plasma seminal melhorou os resultados de integridade das membranas plasmática e acrossomal;

- e a adição de plasma de alta qualidade não melhorou a motilidade dos espermatozóides selecionados por Percoll[®].

REFERÊNCIAS

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

ALVARENGA, M.A; LEÃO, K. M. Hysteroscopic Insemination of Mares With Low Number of Frozen Thawed Spermatozoa Selected By Percoll Gradient. **Theriogenology**, v.58, p.651-653, 2002.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal funcion. In: MCKINNON, A.O.: VOSS, J.L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Fabiger, 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.

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.

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.

BLOM, E. Über Spermauntersuchungenmethoden beim Bullen. **Wienerische Tierärztliche Monatschrift** 36, p.49-168, 1949.

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

BOLLENDORF, A.; CHECK, J.K.; KATSOFF, D.; LURIE, D.; Comparison of direct swim-up mini-Percoll, and Sephadex G10 separation procedures. **Arch. Androl.**, v. 32, n. 2, p. 157-162, 1994.

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.

BRAUN, J.; TORRES-BOGGINO, F.; HOCHI, S.; OGURI, N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Dtsch Tierarzti Wochenchr.**, n.101, v.8, p.319-322, 1994.

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, n.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.

CASEY P.J.; ROBERTSON, K.R.; LIU, I.K.; ESPINOZA, S.B.; DROBNIS, E.Z.; Column separation of motile sperm from stallion semen. **J. Androl.**, v.14, n.2, p.142-148, 1993.

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.

COWART, F.E. Effects of feeds on the reproductive capacity of jack and stallions. M.Sc. Dissertação, Missouri State College, 1979.

DE VRIES, A.C.J.; COLEMBRANDER, B. Isolation of mature and immature boar spermatozoa on self-generating Percoll density gradients. IN: **11TH INT. CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND A.I., Proceedings**, p. 238, 1988.

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

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.

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.**, v.42, n.1, 136-156, 1966.

DROBNIS, E.Z.; ZHONG, C.Q.; OVERSTEER, J.W. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing or Percoll gradients. **J. Androl.**, v. 12, p.201-208, 1991.

EINARSSON, S.; VIRING S. Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. **J Reprod Fertil**, v.32, n.1, p.117-20,1973.

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.

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.

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

GOMES, G.M.; LEÃO, K.M.; MACEDO, L.P.; PAPA, F.P.; JACOB, J.C.F.; OLIVEIRA, J.V.; MACHADO, M.S.; ALVARENGA, M.A. Efeito da seleção espermática por gradiente de percoll e inseminação artificial por endoscopia, sobre a fertilidade ao utilizar baixa dose de sêmen congelado de garanhão. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n.3, 2003.

GRAHAM, E.F.; GRAHAM, J.K. The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and fertility of bovine semen. **J. Dairy Sci.**, v. 73, p. 91-97, 1990.

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

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.

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.

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, 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, 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, 1989.

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

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.

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 eqüinos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina 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.; HURTGEN, 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 immunology. **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.

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

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

KOHNE, K.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E.; KLUG, E. Osmotische Resistenz von Hengstspemien 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), Tierärztliche Hochschule – Hannover, Deutschland, 1966.

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

LE LANNOU, D.; BLANCHARD, Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. **J. Reprod. Fertil.**, v.84, n.2, p.551-556, 1988.

LEÃO, K.M. **Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozóides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2002.

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

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. Biochemistry of stallion semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.23. p.47-52, 1975.

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, p. 265-307, 1964.

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. **Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS, 1995.

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

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.

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), Tierärztliche Hochschule, Hannover, Deutschland, 1994.

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

MEIRELLES, 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.

MEIRELLES, L.S.; LAGARES, M.A.; BRITO, E.L. R.; SILVEIRA, G.B.; CONCEICÃO, T.R.; BAHNIUK, M.C.; PABST, 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.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 5.ed., Porto Alegre: Sulina, 1982. 2v.

MORRIS, L.H.; HUNTER, R.H.; ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **J. Reprod. Fertil.**, v.118, n.1, p. 95-100, 2000.

MORTIMER, D. Sperm preparation methods. **J. Androl.**, v.21, p.357-366, 2000.

NIE, G.J.; JONSON, K.E.; WENZEL, J.G. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. **Anim. Reprod. Sci.**, v.79, n.1-2, p.103-109, 2003.

OSHIO, S. Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. **Gamete Res.**, v.20, n.2, p. 159-164, 1988.

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

PACE, M.M.; J.J. SULLIVAN.; Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 23:115-121, 1975

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), v.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.

PICKETT, B.W. Seminal extender and cooled semen. In: MCKINNON, A. O.: VOSS, J.L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Fabiger, p.746-754, 1993.

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.; 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, n.2, 1975.

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

PIMENTEL, C.A.; SANTOS, P.F.M; ALVES, A.M.; HAMMES, A.M. Biopsia endometrial em eqüinos. IN: **Laboratório Regional de Diagnósticos. Doenças Diagnosticadas no Ano de 1989**. Pelotas, UFPEL, 1989.

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.

RHEMREV, J.; JEYEDRAN, R.S.; VERMEIDEN, J.P., ZANEVELD, L.J. Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. **Fertil. Steril.**, v.51, n.4, p.685-690, 1989.

SCHARMA, R.K.; SEIFARTH, K.; AGARWAL, A. Comparision of single-and-two-layer Percoll separation for selection of motile spermatozoa. **Int. J. Fertil. Womens Med.**, v.42, n.6, p.412-417, 1997.

SCHMITT, F.L. **A concentração , a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen eqüino a +4°C**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária,UFRGS, 2002.

SIEME, H.; KLUG, E.; BADER, H.; Separation techniques to achieve vital and reproduction competent equine spermatozoa populations – a survey; **Dtsch. Tieraztl. Wochenschr.**, v.104, n.8, p.298-302,1997.

SIEME, H.; MARTINSSON, G.; RAUTERBERG, H.; WALTER, K.; AURICH, C.; PETZOLD, R.; KLUG, E.; Application of techniques for sperm selection in fresh and Frozen-thawed stallion semen. **Reprod. Dom. Anim.**; v.38, p.134-140, 2003.

SINGER, R.; FISH, B.; LEVINSKY, H.; ZUKERMAN, Z.; SAGIV, M.; COHEN, A.; BARNET, M.; LURIE, B.B.; LAHAV, M. Separation of human semen on Percoll gradients: effect on percentage of motile and morphologically normal sperm and proportion of acrosome reacted sperm. **Int. J. Fertil. Menopausal Stud.**, v.40, n. 3, p.161-166, 1995.

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

SUZUKY, K.; GESHI, M.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. **Anim. Reprod. Sci.**, v.77. p. 157-172, 2003.

TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. **J. Reprod. Fertil.**, v.41, p.329-335, 1974.

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.

TURNER, J.L.; ARNS, M.J. Effect of density gradient composition on in vitro maturation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v.18, p.260-265, 1998.

VAN DER HOLST, W. Stallion semen production in artificial insemination programs in the Netherlands. IN: COURROT, M. **The Male in Farm Animal Reproduction**, Boston: Courout Martinius 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. Composition of seminal extenders and its effect on motility of equine spermatozoa. **ANNUAL METTING – SOCIETY OF THERIOGENOLOGY, 1991, Proceedings**, p.146-150, 1991.

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, n.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 storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

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.

VIJATRASIL, S.; MAKEMAHARN, O.; UPAISILSATHAPORN, P. Application of the hypo-osmotic swelling test to spermatozoa prepared by swim-up and discontinuous Percoll separation. **Int. J. Androl.**, v.18, suppl.1, p.19-22, 1995.

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.

WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G, ed. **Marshall's Physiology of Reproduction**. Edinburgh, London: Churchill Livingstone; 1990: 747-869

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

PRODUTOS	SAIS	SOLUÇÕES
H ₂ O		50ml
NaCl	0,2886g	
KCl	0,01155g	115,5µl (a)
NaHCO ₃	0,105g	
Hepes	0,119g	
Vermelho Fenol	0,00025g	250µl (b)
Lactato de Sódio Xarope 60%		185µl
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,01115g	111,5µl (c)
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0147g	147µl (d)
NaH ₂ PO ₄	0,002g	500µl (e)
Ác. Pirúvico (sais Na)*		

adicionado na hora do uso - 70µl por cada 5ml de solução.

SOLUÇÕES	SAIS	DILUIÇÕES
(a)	KCl	(1g/10ml)
(b)	Vermelho de Fenol	(0,01g/10ml)
(c)	MgCl ₂ 6H ₂ O	(1g/10ml)
(d)	CaCl ₂ 2H ₂ O	(1g/10ml)
(e)	NaH ₂ PO ₄	(0,04g/10ml)
(f)	Piruvato de Sódio	(0,04g/5ml)

APÊNDICE B

Modelo Linear Geral

Fator	Níveis	Valores			
Velocidade	4	v1	v2	v3	v4
Espermatozóides	2	50	100		

Análise de Variância

Fontes de Variação	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj MQ	F	P
Velocidade	3	67.5	67.5	22.5	0.12	0.947
Espermatozóides	1	10.0	10.0	10.0	0.05	0.817
Veloc.* Espermat.	3	10.0	10.0	3.3	0.02	0.997
Erro	32	5910.0	5910.0	184.7		
Total	39	5997.5				

APÊNDICE C

Modelo Linear Geral

Fator	Níveis	Valores			
Velocidade	4	v1	v2	v3	v4
Espermatozóides	2	50	100		

Fontes de Variação	GL	SQ	Adj SQ	Adj MQ	F	P
Velocidade	3	5.48	5.48	1.83	0.05	0.984
Espermatozóides	1	1.22	1.22	1.22	0.03	0.854
Veloc.* Espermat.	3	0.47	0.47	0.16	0.00	1.000
Erro	32	1131.60	1131.60	35.36		
Total	39	1138.77				

APÊNDICE D

Varável Dependente: SQ espermatozóides

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Modelo	11	84.74368862	7.70397169	10.98	0.0001
Erro	28	19.64196220	0.70149865		
Total Corrigido	39	104.38565081			

Fontes de Variação	GL	Tipo I	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Ejaculados	4	44.42494744	11.10623686	15.83	0.0001
Velocidade	3	22.36812844	7.45604281	10.63	0.0001
Espermatozóides	1	15.25434957	15.25434957	21.75	0.0001
Velocidade. Média* Espermatozóides	3	2.6962316	0.89875439	1.28	0.3001

APÊNDICE E

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Modelo	41	2896.01852189	70.63459809	80.82	0.0001
Erro	774	676.45541693	0.87397341		
Total Corrigido	815	3572.47393882			

Fontes de Variação	GL	Tipo III SQ	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Equino	3	438.8619202	146.28732734	167.38	0.0001
Tratamento	5	224.90447047	44.98089409	51.47	0.0001
Equino*Tratamento	15	20.88890714	1.39259381	1.59	0.0697
Hora	3	2095.19403870	698.39801290	799.11	0.0001
Tratamento*Hora	15	55.62526697	3.70835113	4.24	0.0001

Tabela com os valores médios e desvios-padrão de motilidade total de sêmen equino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

	0 h	24 h	48 h	72 h
C	80 ± 12	62 ± 20	42 ± 18	24 ± 18
Cc	79 ± 11	66 ± 14	48 ± 18	31 ± 17
Sp	94 ± 2	84 ± 10	66 ± 16	41 ± 23
Hp	93 ± 2	80 ± 10	58 ± 18	30 ± 22
Ap	94 ± 2	82 ± 13	63 ± 16	60 ± 16
Bp	93 ± 3	80 ± 14	60 ± 16	35 ± 23

(p < 0,05)

APÊNDICE F

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	P
Modelo	41	467493.14752674	11402.27189090	59.96	0.0001
Erro	774	147176.08654189	190.14998261		
Total Corrigido	815	614669.23406863			

Fontes de Variação	GL	Tipo III SQ	Média dos Quadrados	F	P
Eqüino	3	51510.73368984	17170.24456328	90.30	0.0001
Tratamento	5	33404.23074985	6680.84614997	35.13	0.0001
Eqüino*Tratamento	15	8262.32682709	550.82178847	2.90	0.0002
Hora	3	362614.98406863	120871.66135621	635.66	0.0001
Tratamento*Hora	15	4055.09681373	270.33978758	1.42	0.1302

Tabela dos valores médios e desvios-padrão de motilidade progressiva de sêmen eqüino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

	0 h	24 h	48 h	72 h
C	42 ± 17	26 ± 16	10 ± 9	6 ± 7
Cc	46 ± 20	29 ± 13	14 ± 10	8 ± 7
Sp	78 ± 16	49 ± 18	29 ± 16	15 ± 14
Hp	72 ± 20	41 ± 19	19 ± 13	8 ± 8
Ap	78 ± 17	47 ± 18	25 ± 16	13 ± 13
Bp	73 ± 18	41 ± 16	21 ± 14	9 ± 10

(p<0,05)

APÊNDICE G

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Modelo	41	731.05781529	17.83067842	30.31	0.0001
Erro	774	455.37570187	0.58834070		
Total Corrigido	815	1186.43351716			

Fontes de Variação	GL	Tipo III SQ	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Eqüino	3	119.62448938	39.87482979	67.38	0.0001
Tratamento	5	30.66801204	6.13360241	10.43	0.0001
Eqüino*Tratamento	15	10.52186757	0.70145784	1.19	0.2718
Hora	3	552.67003676	184.22334559	313.12	0.0001
Tratamento*Hora	15	9.39062500	0.62604167	1.06	0.3866

Tabela dos valores médios e desvios-padrão de vigor de sêmen eqüino submetido a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

	0 h	24 h	48 h	72 h
C	4,3 ± 0,6	3,2 ± 0,8	2,6 ± 0,8	1,6 ± 1
Cc	4,4 ± 0,6	3,8 ± 0,7	3,2 ± 0,8	2,3 ± 1
Sp	4,5 ± 0,5	4,1 ± 0,6	3,4 ± 0,9	2,5 ± 1
Hp	4,3 ± 0,5	3,8 ± 0,7	2,9 ± 0,9	2,0 ± 1
Ap	4,5 ± 0,6	4,1 ± 0,6	3,4 ± 0,8	2,3 ± 1
Bp	4,3 ± 0,5	3,8 ± 0,5	3,8 ± 0,5	2,2 ± 1

(p < 0,05)

APÊNDICE H

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Modelo	41	1473.64043628	35.94244967	32.99	0.0001
Erro	774	843.27528076	1.08950295		
Total Corrigido	815	2316.91571704			

Fontes de Variação	GL	Tipo III SQ	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Eqüino	3	541.71086973	180.57028991	165.74	0.0001
Tratamento	5	75.31037386	15.06207477	13.82	0.0001
Eqüino*Tratamento	15	106.08502094	7.07233473	6.49	0.0001
Hora	3	716.42772111	238.80924037	219.19	0.0001
Tratamento*Hora	15	21.54836190	1.43655746	1.32	0.1840

Tabela dos valores médios e desvios-padrão de espermatozóides eqüinos com membrana plasmática funcional, após diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

	0 h	24 h	48 h	72 h
C	44 ± 22	30 ± 23	20 ± 18	17 ± 19
Cc	48 ± 17	39 ± 14	30 ± 17	25 ± 17
Sp	53 ± 16	37 ± 14	26 ± 14	21 ± 14
Hp	47 ± 21	30 ± 17	16 ± 14	11 ± 12
Ap	48 ± 18	28 ± 15	18 ± 13	15 ± 13
Bp	48 ± 20	31 ± 16	18 ± 14	16 ± 14

(p < 0,003)

APÊNDICE I

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Modelo	41	114814.48830214	2800.35337322	12.14	0.0001
Erro	774	178591.95164884	230.73895562		
Total Corrigido	815	293406.43995098			

Fontes de Variação	GL	Tipo III SQ	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Eqüino	3	33911.91444593	11303.97148198	48.99	0.0001
Tratamento	5	6998.47211435	1399.69442287	6.07	0.0001
Eqüino*Tratamento	15	16043.33978758	1069.55598584	4.64	0.0001
Hora	3	49459.07230392	16486.35743464	71.45	0.0001
Tratamento*Hora	15	2805.58210784	187.03880719	0.81	0.6665

Tabela dos valores médios e desvios-padrão de espermatozóides eqüinos com membrana plasmática íntegra, submetidos a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

	0 h	24 h	48 h	72 h
C	44 ± 21	34 ± 20	29 ± 20	20 ± 22
Cc	47 ± 17	42 ± 13	37 ± 16	31 ± 15
Sp	53 ± 16	45 ± 14	42 ± 15	39 ± 13
Hp	50 ± 17	42 ± 14	33 ± 17	26 ± 15
Ap	53 ± 17	41 ± 17	34 ± 18	28 ± 15
Bp	54 ± 18	44 ± 14	35 ± 17	31 ± 16

(p < 0,0080)

APÊNDICE J

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Modelo	41	167131.79536542	4076.38525282	18.24	0.0001
Erro	774	173018.36149733	223.53793475		
Total	815	340150.15686275			

Fontes de Variação	GL	Tipo I SQ	Média dos Quadrados	Valor F	Pr > F
Eqüino	3	64608.42756982	21536.14252327	96.34	0.0001
Tratamento	5	33630.52450980	6726.10490196	30.09	0.0001
Eqüino*Tratamento	15	19396.56387403	1293.10425827	5.78	0.0001
Hora	3	47066.59803922	15688.86601307	70.18	0.0001
Tratamento*Hora	15	2429.68137255	161.97875817	0.72	0.7608

Tabela dos valores médios e desvios-padrão de espermatozóides eqüinos com membrana acrossomal íntegra, submetidos a diferentes tratamentos e resfriado a +4°C, nos diferentes tempos de observação

	0 h	24 h	48 h	72 h
C	53 ± 21	44 ± 21	37 ± 23	29 ± 26
Cc	56 ± 17	52 ± 14	46 ± 16	41 ± 16
Sp	70 ± 15	63 ± 15	60 ± 16	56 ± 13
Hp	64 ± 16	56 ± 14	47 ± 18	39 ± 17
Ap	64 ± 16	53 ± 17	49 ± 20	41 ± 17
Bp	66 ± 15	57 ± 14	48 ± 19	44 ± 17

(p < 0,05)