

JOÃO GABRIEL DA SILVA NEVES

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE SOBRE A
COMPOSIÇÃO PROTÉICA E QUALIDADE SEMINAL DE
GARANHÕES MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Câmpus Viçosa

T

N518i
2011

Neves, João Gabriel da Silva, 1984-

Influência da sazonalidade sobre a composição protéica e
qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador / João
Gabriel da Silva Neves. - Viçosa, MG, 2011.
x, 50f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.33-44.

1. Cavalo (Mangalarga). 2. Equino. 3. Sêmen. 4. Proteína.
5. Sazonalidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.
II. Título.

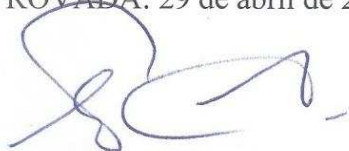
CDD 22. ed. 636.1

JOÃO GABRIEL DA SILVA NEVES

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE SOBRE A COMPOSIÇÃO PROTÉICA E
QUALIDADE SEMINAL DE GARANHÕES MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

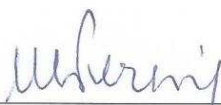
APROVADA: 29 de abril de 2011.



Prof. Eduardo Paulino da Costa



Prof. Ciro Alexandre Alves Torres



Profa. Maria Cristina Baracat Pereira



Prof. José Domingos Guimarães
(Orientador)

*Reparta o seu conhecimento. É uma
forma de alcançar a imortalidade
(Dalai Lama)*

*"Não se mede o valor de um homem
pelas suas roupas ou pelos bens que
possui; o verdadeiro valor de um
homem é o seu caráter, suas idéias e a
nobreza de seus ideais". (Charles
Chaplin)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus caminhos e ser a força diária para enfrentar cada desafio.

A minha família, por todo apoio durante os momentos mais delicados.

Ao meu orientador José Domingos Guimarães, por acreditar em minhas propostas, principalmente nos momentos de dificuldade.

A professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela enorme paciência e dedicação ao nosso trabalho.

A grande amiga Bruna Waddington, pessoa fundamental para que este projeto fosse finalizado.

Aos meus coorientadores Lincoln Amorim e Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela orientação.

Aos professores, Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo, Simone Elisa Facioni Guimarães e Tânia Toledo, por disponibilizarem os laboratórios para realização das análises.

Aos amigos da Pós-graduação Leonardo, Erick, Bruno, Lina, Ludmila, Priscila, Renan, Daniel, Pedro, Guilherme, Carlos e principalmente ao Rogério, pela ajuda no decorrer dos experimentos.

Aos estagiários, Anderson, Pedro, Thiago, Matheus, Denise, Manuela, Yamê e tantos outros que colaboraram ao longo dos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Proteômica, Meire, Hebréia, Marcos, Ana, Patrícia e Naiara, pela ajuda nas análises bioquímicas.

Ao amigo Fernando de Freitas e a todos os funcionários do Setor de Equideocultura da UFV.

Aos “irmãos” de Viçosa, Alberto, Marcus Vinícius e Jurandy, pelas incontáveis parcerias.

Aos Piôkas, Pedro Meloni, Arthur, Pedro III, Augusto e Carlos, pela amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Ambiente térmico.....	3
2.2. Avaliação da qualidade seminal.....	4
2.3. Sazonalidade.....	6
2.4. Testosterona.....	7
2.5. Proteínas do plasma seminal.....	8
2.6. Glicose.....	11
2.7 Lipídeos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Localização geográfica.....	12
3.2. Instalações e manejo dos animais.....	12
3.3. Parâmetros Ambientais.....	13
3.4. Coleta do sêmen.....	13
3.5. Análise seminal.....	14
3.6. Análises bioquímicas.....	16
3.6.1. Proteína total do plasma seminal.....	16
3.6.2. Colesterol total do plasma seminal.....	18
3.6.3. Glicose do plasma seminal.....	18
3.6.4 Identificação das proteínas do plasma seminal.....	19
3.7. Perfil sérico de testosterona e cortisol.....	20
3.8. Análise estatística.....	21
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
7. ANEXOS.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Parâmetros físicos do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações do ano

Tabela 02: Média do Índice de Globo e Umidade (ITGU) em duas miniestações climáticas no setor de Equideocultura da UFV e a intensidade luminosa, de 29/04/2009 a 14/04/2010

Tabela 03: Concentração de proteínas no plasma seminal de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações bioclimáticas por dois métodos bioquímicos distintos

Tabela 04: Integridade de membrana plasmática de espermatozóides de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações do ano, analisado pelo teste de epifluorescência

Tabela 05: Ponto isoelétrico e peso molecular das proteínas do plasma seminal de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações do ano, determinados por eletroforese bidimensional

Tabela 06: Peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas solúveis com maior frequência no plasma seminal de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, ao longo das estações do ano

Tabela 07: Concentração de glicose e de colesterol no plasma seminal de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das estações bioclimáticas

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Curva padrão obtida pelo método de Bradford (1976) para mensuração das concentrações de proteínas do plasma seminal de eqüinos

Figura 02: Curva padrão obtida pelo método do ácido bicinconínico (Smith et al, 1985) para mensuração das concentrações de proteínas do plasma seminal de equinos

Figura 03: Relação entre a concentração de proteínas do plasma seminal e a concentração sérica de testosterona em garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações bioclimáticas

RESUMO

NEVES, João Gabriel da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011.
Influência da sazonalidade sobre a composição protéica e qualidade seminal de garanhões Mangalarga Marchador. Orientador: José Domingos Guimarães.
Coorientadores: Giovanni Ribeiro de Carvalho e Lincoln da Silva Amorim.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência das estações bioclimáticas da Zona da Mata Mineira sobre a composição bioquímica do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Foram utilizados três garanhões de fertilidade comprovada, dois com 15 anos de idade e outro com sete anos. O sêmen foi coletado a cada 14 dias, durante o período de um ano (abril de 2009 a abril de 2010) totalizando 26 coletas, perfazendo 78 ejaculados. Foi realizada a análise física e morfológica do sêmen. O plasma seminal foi separado para análise da concentração das proteínas solúveis, de glicose e de colesterol para a determinação do perfil das proteínas presentes nos ejaculados ao longo das estações do ano. O perfil das proteínas foi avaliado pelo método de eletroforese bidimensional e as análises foram realizadas no programa IMAGEMASTER, da GE-HEALTCARE. Quanto às características físicas do sêmen, houve um maior volume de sêmen na primavera e no verão ($p < 0,05$) porém, a quantidade de espermatozóides foi a mesma para todas as estações do ano ($p > 0,05$). Com relação aos aspectos físicos do sêmen, a concentração de proteínas no plasma diferiu entre os métodos utilizados ($p < 0,05$) porém, a correlação entre si foi muito alta e positiva ($r = 0,73$). A concentração protéica no plasma seminal teve correlação positiva apenas com a quantidade de espermatozóides por ejaculado, porém baixa ($r = 0,36$). Não houve correlação entre as concentrações de proteínas e a concentração de testosterona sérica. Um grupo variado de proteínas foi encontrado pelo método de eletroforese bidimensional, sendo que 10 dessas proteínas foram comuns aos três garanhões. No outono, observou-se uma proteína de 18 kDa/pI=9,1; na primavera observou-se duas: de 22 kDa/pI= 6,7 e 35 kDa/pI= 7,2; no verão observou-se três: 20 kDa/pI= 8,2; 27 kDa/pI= 8,0 e 29 kDa/pI= 7,5; uma proteína foi comum às estações de Outono, Inverno e Primavera: 9 kDa/pI= 9,0 e três proteínas foram comuns a todas as estações bioclimáticas: 4 kDa/pI=5,8; 7 kDa/pI=7,0 e 11 kDa/pI=7,5. Além dessas proteínas,

uma série de proteínas com peso molecular inferior a 30 kDa foram observadas individualmente. As concentrações de glicose e colesterol no plasma seminal não apresentaram variação sazonal ($p>0,05$) ou correlação com qualquer característica estudada ($p>0,05$). Conclui-se no presente estudo que os parâmetros bioquímicos do sêmen sofrem maior variação intrínseca que sazonal, havendo algumas proteínas que são comuns aos garanhões Mangalarga Marchador.

ABSTRACT

NEVES, João Gabriel da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2011. **Influence of seasonality over the proteic composition and the seminal quality of Mangalarga Marchador stallion.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Giovanni Ribeiro de Carvalho and Lincoln da Silva Amorim.

The aim of this study was to evaluate the biochemistry composition of the seminal plasma in Mangalarga Marchador stallions as to evaluate the influence of bioclimatic seasons in the Zona da Mata Mineira over its content. Thus, three stallions with proved fertility were used. Two of them with 15 years old and the other with seven years old. The semen was collected every 14 days, during one year (April 2009 to April 2010) totalizing 26 collects, in a total of 76 samples. The physical and morphological parameters of the spermatozoa were evaluated. A semen sample was taken and the seminal plasma was separated to measure the concentration of soluble proteins, glucoses and cholesterol concentration and to find the protein profile in the ejaculates grouped in each season. The protein profile was done by two-dimensional electrophoresis and analyses were done by IMAGEMASTER program (GE HEALTHCARE). About the physical parameters of the semen, there was a bigger volume of semen during Spring and Summer ($p < 0.05$) but the quantity of spermatozoa was the same for all seasons ($p > 0.05$). Protein concentration in seminal plasma differed between methods used ($p < 0.05$) although the correlation between them were high and positive ($r = 0.73$). The seminal plasma protein concentration had a positive correlation only with the quantity of spermatozoa in the ejaculated and, even so, was weak ($r = 0.362$). There were no correlation between the protein concentration and the serum testosterone concentration. A diverse group of proteins were found thorough the two-dimensional electrophoresis method. Ten of those proteins were common to all three stallions. In Autumn, was found a 18 kDa/pI 9.1 protein; during Spring, were found two proteins: 22 kDa/pI 6.7 and 35 kDa/pI 7.2; in Summer, were found three: 20 kDa/pI 8.2; 27 kDa/pI 8.0 and 29 kDa/pI 7.5; one protein was common to Autumn, Winter and Spring 9 kDa/pI 9.0 and three proteins were common to all seasons: 4 kDa/pI 5.8 ; 7 kDa/pI 7.0 and 11 kDa/pI 7.5. Beyond those proteins, a bunch of other polypeptides with molecular

weight less than 30 kDa were found individually. Concentrations of glucose in seminal plasma does not show a seasonal variation ($p>0.05$) or correlation with any other evaluated parameter. The same occurs to seminal plasma cholesterol concentrations. It is concluded that biochemistry of seminal parameters have greater intrinsic variation than seasonal, showing some proteins that are common to Mangalarga Marchador stallions.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de eqüinos na América Latina e o terceiro mundial. Somados aos muares (mulas) e asininos (asnos) são oito milhões de cabeças, movimentando R\$ 7,3 bilhões, somente com a produção de cavalos.

O rebanho envolve mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final, e compõe a base do chamado Complexo do Agronegócio Cavalo, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. (MAPA, 2011)

Ao contrário do que acontece nas outras espécies de produção, os eqüinos não são selecionados pelo seu potencial reprodutivo, e sim por outras características como forma de andar e aspecto físico (HAFEZ & HAFEZ, 1995). Dessa maneira, encontram-se em nossa rotina garanhões com qualidade seminal insatisfatórias. Muitas vezes, os fatores relacionados à má qualidade do sêmen desses animais não é identificada, visto que, as análises atualmente utilizadas para predizer o potencial reprodutivo de um macho baseiam-se em parâmetros físicos e morfológicos dos espermatozóides. As análises de morfologia e motilidade espermática são apenas indicadores rudimentares de sua capacidade fertilizante (BLOTTNER, 2001).

Os equinos são animais poliestrais sazonais, sendo que a atividade reprodutiva é primariamente regulada pelo fotoperíodo (DAEL & HUGHES, 1993). O reflexo dessa sazonalidade sobre os gametas masculinos é demonstrado nas diferenças estruturais e integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides.

As diferenças circanuais afetam a composição e o conteúdo hormonal do plasma seminal (HOFFMANN & LANDECK, 1999), e alguns fatores presentes no plasma seminal interagem com a superfície dos espermatozóides, modificando as características de sua membrana. Um desses componentes são as proteínas. Esses polipeptídeos do plasma seminal são originários principalmente do epidídimo e das glândulas acessórias. Estão envolvidos no remodelamento da superfície espermática que ocorre durante o trânsito desses gametas pelos órgãos genitais masculinos e continuam após a ejaculação. As proteínas do plasma seminal têm sido apresentadas como responsáveis por algumas etapas do processo de fertilização, como o estabelecimento das reservas espermáticas no

oviduto, a modulação da capacitação e a interação entre gametas (TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

Dessa forma, a detecção de fatores protéicos do plasma seminal que possam ser empregados como marcadores bioquímicos poderiam ser usados como critério para a predição da fertilidade em machos (FRASER et al., 2006)

Assim sendo, o presente estudo teve o objetivo de:

1 - caracterizar alguns componentes bioquímicos presentes no plasma seminal dos eqüinos e correlacioná-los aos parâmetros físicos e morfológicos dos espermatozóides, atualmente utilizados;

2 – verificar a influência das variações sazonais sobre os componentes bioquímicos do plasma seminal nos garanhões Mangalarga Marchador na Zona da Mata Mineira;

3 – verificar a influência da sazonalidade sobre os parâmetros físicos e morfológicos dos espermatozóides;

4 – verificar a influência das variações sazonais da testosterona sobre os parâmetros bioquímicos do plasma seminal dos eqüinos;

5 – verificar se há diferença do uso dos métodos colorimétricos de Bradford e do Ácido Bicinconínico para identificação das proteínas solúveis no plasma seminal dos garanhões;

6 – traçar o perfil protéico do plasma seminal de garanhões Mangalarga Marchador .

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ambiente térmico

O bem-estar, o desempenho produtivo e a saúde dos animais são influenciados pelas condições meteorológicas. As altas temperaturas do ar, principalmente quando associadas a altas umidades relativas e radiação solar global intensa são causas de redução na produção (OLIVEIRA, 2008). A temperatura e umidade do ar, a radiação e o vento, são os elementos climáticos que mais afetam a temperatura corporal dos animais, podendo exercer efeitos marcantes sobre o seu bem-estar, com consequências no desempenho produtivo (BAÊTA & SOUZA, 1997).

Embora os animais respondam de formas diferentes às condições ambientais desfavoráveis, sempre se comportam como um sistema termodinâmico, com trocas constantes de energia com o ambiente. Nesse processo, o ambiente interno dos animais sofre influência de variações externas, a ponto de muitas vezes o animal recorrer a ajustes fisiológicos, traduzidos em consumo de energia, na maioria das vezes, desviada das funções produtivas e reprodutivas (ENCARNAÇÃO, 1983).

Segundo Muller (1989), para a maioria dos animais domésticos, a temperatura corporal aumenta acima do nível normal em resposta à elevação de temperatura ambiente, sendo esta resposta dependente do tempo de exposição, da adaptação ao calor e do nível de produção do animal. De acordo com Amann (1993b), o testículo dos gaurhões deve estar sempre com a temperatura abaixo da temperatura corporal para que haja uma normal espermatogênese. Baseando-se no estudo com outras espécies, o autor relatou que se a temperatura intratesticular se igualar à temperatura corpórea por um longo intervalo ou chegar a 40,5 °C por até 2 horas, alguns células germinativas degeneram e morrem. Os espermátócitos primários são especialmente sensíveis ao calor, porém as espermatogônias B e as espermátides arredondadas também podem ser afetadas pelo aumento da temperatura. Conseqüentemente, poderá ser observado um declínio transitório na quantidade de espermatozóides no ejaculado, 40 dias após ter ocorrido o estresse térmico.

Uma forma de se avaliar o ambiente térmico em que o animal está inserido é pelo Índice de Temperatura e Umidade (ITU). Originalmente desenvolvido por Thom

(1977), como um índice de conforto térmico humano, esse índice tem sido usado para descrever o conforto térmico dos animais, desde que reportaram significativas quedas na produção de leite em vacas, associadas a aumentos no valor de ITU. De acordo com HAHN (1985), um valor de ITU igual a 70 ou menos indica condição normal, não estressante; um valor entre 71 e 78 é crítico; entre 79 e 83 indica perigo, e acima de 83 já constitui uma emergência. Segundo esse autor, tais faixas seriam válidas para os animais domésticos em geral, e não somente vacas, sendo assim considerado válido para eqüinos.

Sob condições de clima tropical, o animal pode estar exposto à carga térmica radiante maior que sua produção de calor metabólico, resultando em alto nível de desconforto (KELLY & BOND, 1971). Nesse caso, somente o ITU não reflete o ambiente térmico e, portanto não seria o mais adequado para avaliar o desconforto e subseqüentes perdas na produção sob essas condições (AGUIAR, 1999). Foi então proposto por Buffington et al. (1977), para vacas leiteiras, uma modificação do ITU, que recebeu a denominação de Índice de Temperatura de Globo e Umidade (ITGU), o qual seria um indicador mais acurado do que o ITU do conforto térmico de vacas expostas a ambientes tropicais, com temperaturas elevadas e radiação solar intensa. Esse índice quando utilizado em ovinos também demonstrou superioridade em relação ao ITU (HAHN, 1985).

2.2. Avaliação da qualidade seminal

A fertilidade dos espermatozóides pode ser demonstrada por diversas análises. A motilidade espermática é considerada um teste laboratorial de fundamental importância para testar um ejaculado (VARNER et. al, 2008). Vários estudos têm avaliado o sêmen fresco e criopreservado. Variações na motilidade espermática, viabilidade e integridade de membrana existem tanto entre garanhões, como no sêmen de um mesmo garanhão (GEBAUER et al., 1976; BRAUN et al., 1994; VIDAMENT et al., 1997; BATELLIER et al., 2001; ALGHAMDI et al., 2002; SCHEMBRI et al., 2003; GOOLSBY et al., 2004).

Apesar disso, estudos demonstram que a motilidade espermática dos eqüídeos não tem sofrido efeito significativo ao decorrer das estações bioclimáticas (PICKET et

al., 1972; 1976 E 1983; MORAIS, 1990; WRENCH et al., 2010). Gastal et al. (1997) observaram que em jumentos não houve variação sazonal na motilidade e quantidade de espermatozóides morfológicamente anormais. Porém, relatou que nos meses de janeiro e fevereiro (no hemisfério sul) houve um menor valor percentual de espermatozóides móveis no ejaculado.

Entretanto, em estudo realizado por Morte et al. (2008), foi verificada diferença entre os parâmetros quantitativos (concentração espermática, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, morfologia espermática e integridade acrossomal) dos animais considerados férteis para os subférteis. O mesmo autor relatou em seu experimento (realizado em Coimbra, Portugal) que houve uma diferença na qualidade espermática avaliada pelos padrões clássicos entre estações bioclimáticas diferentes, para ambos os grupos. Já Wrench et al. (2010) demonstraram, em estudo semelhante, que não houve diferença entre os mesmos parâmetros, entre as diferentes estações.

Há uma série de parâmetros espermáticos que são utilizados para qualificar os espermatozóides, como motilidade progressiva, número total de espermatozóides, vigor espermático e morfologia espermática, de modo que a taxa de espermatozóides morfológicamente normais correlaciona-se positivamente com a taxa de fertilidade (MORRELL et al., 2008; JASKO et al., 1990; AMANN, 1989).

Como a integridade da membrana plasmática é de fundamental importância para que ocorra o processo de fecundação, parâmetros adicionais são necessários para prever a qualidade espermática. Para tal propósito, dois testes têm sido utilizados para avaliar a integridade da membrana: os corantes supravitais e o teste hiposmótico (HOST) (NEIL et al., 1997). Um sensível corante fluorescente constituído de diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (PI), foi desenvolvido por Harrison e Vickers (1990). Sua ação é baseada na hidrólise do CFDA com as células espermáticas, por meio de esterases, produzindo carboxifluoresceína livre, que é retida quando a membrana celular está intacta. A ação do PI ocorre penetrando a membrana espermática das células lesadas e se ligando ao DNA. Já o teste hiposmótico consiste em avaliar se a membrana plasmática está funcional. Quando exposta a uma solução hiposmótica, a célula espermática íntegra sofre edemaciamento e, como consequência, ocorre o enrolamento de sua cauda (ALVES et al., 2005; NEILD et al., 1997).

2.3. Sazonalidade

Semelhante aos outros mamíferos, os eqüinos restringem seu potencial reprodutivo às épocas do ano em que as condições são mais favoráveis ao sucesso do desmame de suas crias (GERLACH et al., 2000). A mudança no comprimento do dia causada pela mudança de estação bioclimática é a maior responsável pelo ritmo circanual da atividade reprodutiva, apesar de não ser o único fator atuante (CHEMINEAU et al., 2008). O equino é uma espécie sazonal poliestral, com sua estação de monta natural ocorrendo de abril a setembro, no hemisfério Norte (NAGY et al., 2000) e de outubro a abril, no hemisfério Sul (GINTHER, 1992). Por essa razão, mudanças no comprimento do dia ao longo do ano influenciam sua atividade gonadal (JANETT et al., 2003).

Nos garanhões, a gametogênese e a função dos órgãos reprodutivos estão otimizadas durante a estação de monta. No inverno, parece haver um decréscimo na produção espermática (JOHNSON et al., 1991), sendo relatadas flutuações relacionadas à sazonalidade para a viabilidade espermática e a motilidade (HOFFMANN et al., 1999; MAGISTRINI et al., 1987). De acordo com Guillaume (1996), a fertilidade nos garanhões pode estar reduzida quando os animais estão fora do período reprodutivo. Já Skalet et al. (1988) relataram que reprodutores que estão em latitudes entre 30° N e 40° N não exibem as mesmas mudanças dramáticas na atividade reprodutiva com a mudança da estação climática, como os animais de latitudes maiores.

Porém, estes estudos são controversos. Janett et al. (2003a) demonstraram que a melhor época para se utilizar o sêmen de garanhões é no período de dias curtos. Neste estudo relataram que, apesar de o volume do ejaculado ser maior durante a estação reprodutiva, o número de espermatozóides morfolologicamente viáveis foi maior no outono.

Gamboa et al. (2010) verificaram que a concentração espermática de garanhões de diferentes raças diminui gradativamente, sendo maior no inverno e decrescendo durante a estação de monta. Porém, a qualidade seminal determinada pela motilidade espermática, morfologia, potencial mitocondrial de membrana e estabilidade de membrana, apresentou melhora, seguindo a mesma linha de tempo. Além disso, os

autores observaram diferenças individuais na qualidade seminal, sendo que essas diferenças foram menos evidente durante a estação reprodutiva. Tal variação individual entre garanhões é evidente e já foi demonstrada em diversas publicações (TISCHNER, 1979; SAMPER et al., 1991; HARKEMA & BOYLE, 1992; BLOTTNER et al., 2001).

A análise da fertilidade de um garanhão só é possível quando este alcança a maturidade sexual. Seria muito benéfico para a indústria eqüestre se o potencial reprodutivo de um garanhão pudesse ser predito ainda na puberdade. Como os eqüinos são reprodutores sazonais, é importante saber como aperfeiçoar os processos de criopreservação, por exemplo, em qual estação bioclimática o sêmen do animal apresenta melhor resistência aos processos de conservação. De acordo com Johnson e Thompson (1987), o garanhão sofre mudanças morfofisiológicas fora da estação reprodutiva, como diminuição do tamanho testicular e diminuição nas concentrações séricas de testosterona. Alguns autores relatam que o momento ideal para coletar o sêmen para criopreservação é a primavera, durante a estação reprodutiva, quando as concentrações espermáticas são médias e os defeitos morfológicos dos espermatozóides estão baixos (MAGISTRINI et al., 1987; BLOTTNER et al., 2001).

Blottner et al. (2001) sugeriram que essa variação sazonal ocorra devido a diferenças circanuais da composição do plasma seminal e dos fatores hormonais. Os componentes do plasma seminal interagem com a superfície do espermatozóide e modificam as características de sua membrana (HOFFMANN & LANDECK, 1999).

2.4. Testosterona

O fotoperíodo parece afetar as características seminais por meio do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em reprodutores estacionais, assim como os eqüinos (PICKETT et al., 1989). Em um garanhão hígido, o aumento dos níveis plasmáticos de testosterona coincide com o aumento da produção espermática, conforme o animal entra na estação reprodutiva (CLAY et al., 1988). Porém, alguns estudos mostraram que a variação na quantidade de testosterona sanguínea não apresenta diferença entre animais férteis e subférteis, para um mesmo período do ano (ROSER & HUGES, 1992).

Sabe-se que a produção espermática de um garanhão, assim como sua produção de testosterona, apresenta flutuação sazonal (JOHNSON, 1991). Tal fato pode tornar as condições sub-ótimas para que ocorra a espermatogênese durante o período de dias curtos, resultando em mudanças na qualidade seminal. Vários autores já demonstraram que, em regiões onde a sazonalidade é claramente demarcada, as concentrações dos hormônios sexuais no plasma sanguíneo demonstram um padrão sazonal definido, tendo um aumento no começo de fevereiro (hemisfério Norte) com picos em abril e maio, e voltando a cair para valores basais de outubro a janeiro (HARRIS et al., 1982; COX et al., 1988; INOUE et al., 1993).

Apesar da sazonalidade comprovada dos eqüinos, os garanhões não sofrem tanto dos efeitos da mudança climática como as éguas. Seus testículos não param completamente de funcionar. Acontece apenas uma diminuição de suas funções, causada por uma menor produção de testosterona fora da estação reprodutiva (ROSER et al., 1991; ROSER et al. 1992 e ROSER et al., 1994). Tal diminuição parece afetar mais a função endócrina que a função germinativa testicular (HOFFMANN & LANDECK, 1999). Em um estudo feito em 1997, Stewart e Roser relataram um aumento nas concentrações de testosterona intratesticulares no período de setembro a fevereiro (hemisfério norte), embora tenham observado uma tendência à diminuição dos níveis de testosterona plasmática em animais considerados inférteis.

2.5. Proteínas do plasma Seminal

A determinação de componentes do plasma seminal como parte da avaliação da qualidade do sêmen de garanhões considerados subféteis ou inférteis pode ser muito útil para o conhecimento e diagnóstico clínico dessas enfermidades. Uma vez que o plasma seminal interfere na longevidade dos espermatozóides, a qualidade seminal poderia ser melhorada por meio de modificações na manipulação do mesmo, principalmente em garanhões que produzem espermatozóides com baixa tolerância aos processos de armazenamento (KARESKOSKI E KATILA, 2008).

O plasma seminal dos mamíferos contém vários componentes distintos que são importantes para a função e sobrevivência dos espermatozóides. Dentre várias funções como diluir, fornecer substratos e servir de meio para os espermatozóides ejaculados, o

plasma seminal também fornece proteínas que interagem com os espermatozóides. Porém, a função dos vários componentes protéicos presentes no plasma ainda são pouco elucidados (BRANDON et al., 1999).

Durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídimo, uma série de componentes é adicionada aos espermatozóides, como algumas proteínas presentes no plasma seminal. Essas proteínas modificam a fluidez da membrana plasmática e, conseqüentemente influenciam na viabilidade espermática. A presença da testosterona no epitélio epididimário é essencial para que ocorra a secreção de certas proteínas. No entanto, algumas são secretadas na ausência do estímulo androgênico (AMANN, 1993). McDowell et al. (1996) observaram diferenças na composição protéica do plasma seminal entre cavalos castrados, cavalos não castrados e cavalos castrados suplementados com testosterona. Os autores observaram cinco grupos de proteínas, sendo considerados andrógeno-dependentes dois destes grupos: 60 kDa - pI 7 e 23 kDa - pI 4 a 5. As demais, não foram relacionadas à produção de testosterona: 25 a 30 kDa - pI 5,5 a 6; 23 kDa - pI 7 a 8 e 15 a 20 kDa - pI 6 a 7,5.

Alguns estudos sugerem que proteínas de baixo peso molecular produzidas pelo epidídimo ligam-se a superfície do espermatozóide e estão envolvidas no processo de maturação espermática. Aparentemente, estas proteínas são andrógeno-dependentes (RETAMAL et al., 2000).

A avaliação dos constituintes protéicos do plasma seminal, identificando proteínas e quantificando-as, é uma forma vantajosa para que os estudiosos pudessem avaliar e correlacionar estes constituintes à qualidade seminal e, conseqüentemente a sua congelabilidade.

A eletroforese das proteínas do plasma seminal têm auxiliado no mapeamento e na identificação das proteínas do plasma seminal de diversas espécies de mamíferos (AUTIERO et al., 1991), sendo a técnica da eletroforese bidimensional utilizada por diversos pesquisadores para tal intuito (BRANDON, 1999; TREIN et al., 2008; NOVAK et al., 2009; NOVAK et al., 2010).

Em um estudo realizado por Jobim et al. (2003), empregando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida a 12%, foram observadas 17 bandas de proteínas de peso molecular variando entre 10 e 80 kDa e ponto isoelétrico entre 3,2 e

8,2, sendo que duas destas proteínas não estavam presentes em garanhões de baixa qualidade seminal e uma foi observada em animais de alta qualidade de sêmen.

De acordo com Amann (1987) a variação que existe no resultado do processo de criopreservação do sêmen equino pode ser relacionada à diferença na composição do plasma seminal entre os indivíduos. Em um estudo realizado pelo mesmo, foram verificadas 27 proteínas no plasma seminal, variando de 13 a 122 kDa, sendo que duas dessas proteínas apresentaram correlação com a motilidade dos espermatozóides após o descongelamento.

Algumas proteínas presentes no plasma seminal têm sido identificadas e relacionadas à qualidade espermática. Exemplos são as proteínas secretoras de cisteína (CRISPs), as proteínas da família das espermadesinas e uma família de proteínas com um número variável de domínios de fibronectina tipo II (REINERT et al., 1996; SCHAMBONY et al., 1998a; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005). Dentre as proteínas da família CRISP, três membros foram relacionados ao potencial reprodutivo dos garanhões, sendo que suas funções específicas ainda permanecem hipotéticas (SCHAMBONY et al., 1998b; MAEDA et al., 1999; COHEN et al., 2000). Giese et al., (2002a,b), demonstraram que os garanhões apresentam variação considerável na expressão genética dessas proteínas.

O perfil protéico das proteínas presentes no plasma seminal de garanhões foi descrito utilizando-se géis de SDS-PAGE. Foram descritas 14 bandas diferentes sendo que sete destas bandas apareceram em todos os ejaculados. Porém, a quantidade que cada uma destas proteínas apareceu, apresentou variação entre os indivíduos estudados (FRAZER & BUCCI, 1996).

As proteínas osteopontina e prostaglandina D2 sintetase foram observadas no sêmen de touros com alto potencial reprodutivo (CANCEL et al., 1997; GERENA et al., 1998). Brandon et al. (1999) observaram 14 bandas de proteínas no sêmen de garanhões, sendo que quatro destas proteínas foram correlacionadas às taxas reprodutivas. Análises posteriores de uma destas proteínas relacionadas ao alto potencial reprodutivo revelaram homologia antigênica com a proteína bovina osteopontina verificada por Cancel e sua equipe (1997). Além disso, levantou-se a hipótese de que, por meio de suas massas moleculares, duas proteínas relacionadas

à baixa fertilidade seriam similares às duas proteínas encontradas em maior abundância em estudo realizado por Calvete et al. (1994) e Frazer e Bucci (1996b).

2.6. Glicose no plasma seminal

Diferente das outras espécies, o sêmen equino possui maior concentração de glicose que frutose (0,82 e 0,02 mg/mL, respectivamente) (AMANN & GRAHAM, 1993). O sêmen de garanhões chega a apresentar o dobro da concentração de glicose que a de frutose, sendo o primeiro, o principal responsável pelo fornecimento de substrato para sobrevivência da célula espermática (BARONOS, 1971).

Apesar de haver uma série de diluidores comerciais que contenham substrato para a sobrevivência dos espermatozóides, Engle et al. (1975) demonstraram que o sêmen de garanhões com maior concentração de glicose endógena apresentava maior durabilidade quando submetidas a ambientes anaeróbicos, semelhante ao ambiente uterino. A movimentação dos espermatozóides necessita de energia. Como as células espermáticas possuem as enzimas necessárias para executar as reações bioquímicas da glicólise, sua concentração no sêmen torna-se limitante para a durabilidade dos gametas masculinos (GARNER E HAFEZ, 1995).

2.7. Lipídeos e a membrana espermática

Uma das características da membrana plasmática dos espermatozóides que influencia em sua sensibilidade à redução da temperatura é a proporção colesterol:fosfolípídeo. Geralmente, quanto maior a concentração de colesterol no plasma seminal, menor é a flexibilidade ou fluidez da membrana plasmática (AMANN & PICKETT, 1987; AMANN & GRAHAM, 1992). A proporção de colesterol:fosfolípídeo na membrana plasmática dos equinos é 0,36; um valor intermediário em relação à proporção encontrada no sêmen de varrões e touros, que são animais considerados maus e bons congeladores de sêmen, respectivamente (AMANN & GRAHAM, 1992; PARKS & LYNCH, 1992).

Durante o processo de resfriamento e congelamento do sêmen, as células espermáticas sofrem danos irreversíveis em sua estrutura de membrana (AMANN &

PICKETT, 1987). Animais que apresentam maior relação colesterol:fosfolipídeos conseguem reduzir a temperatura em que a fase de transição de membrana ocorre. Dependendo desta correlação, esta transição pode até ser eliminada (MORAES, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização Geográfica

O experimento foi realizado no Setor de Equideocultura da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa em Minas Gerais, Brasil com altitude de 649 m e tem como coordenadas geográficas o paralelo de 20° 45' 14'', latitude Sul, e o meridiano de 42° 52' 54'', longitude Oeste. O clima é do tipo tropical de altitude com chuvas durante o verão (WIKIPÉDIA)

3.2. Instalações e Manejo dos Animais

Foram utilizados três garanhões da raça Mangalarga Marchador (animal 1 – 15 anos, 480 Kg; animal 2 – 15 anos, 410 Kg; animal 3 – 7 anos, 405 Kg). Durante o experimento, os animais ficaram alojados em baias individuais de alvenaria de 16 m² com cama de capim gordura trocada diariamente. No período da manhã (07:00 às 14:00) foram soltos em piquetes individuais de capim coast cross e tifton (*Cynodon* spp.) de 225 m². A suplementação foi composta de ração concentrada constituída de 14% de proteína total – 1% do peso vivo do animal, elaborada de acordo com as recomendações do National Research Council (2007) e capim elefante (*Pennisetum purpureum* cv cameroon) com cana (*Saccharum officinarum*) picada (3,5% + 1% do peso vivo, respectivamente), sal mineral e água *ad libitum*. O controle parasitário foi realizado de acordo com o manejo do setor. Antes do início do experimento, foi realizado o exame andrológico dos três animais, sendo considerados aptos à reprodução, de acordo com os padrões preconizados pelo COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA, 1998).

3.3. Parâmetros Ambientais

Como os animais permaneciam em dois ambientes distintos (baías e piquetes), foram instaladas duas miniestações bioclimatológicas compostas de termômetro de máxima e mínima, globo negro e termômetro de bulbo seco e bulbo úmido. Além disso, foi aferida a intensidade de luz no local com o uso de um luxímetro. As informações foram colhidas às 7:00, 9:30, 12:00, 14:30 e 17:00h, uma vez por semana. O parâmetro ambiental utilizado foi o Índice de Globo e Umidade (ITGU) (BUFFINGTON et al., 1977), pela fórmula:

$$\text{ITGU} = 0,72 (\text{GN} + \text{BU}) + 40,6$$

GN – temperatura de globo negro (° C)
BU – temperatura de bulbo úmido (° C).

3.4. Coleta do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas a cada quinze dias, durante o período de um ano (29 de abril de 2009 à 14 de abril de 2010), totalizando 26 coletas por animal. Quinze dias antes da primeira coleta, foi realizada a esgota das reservas extragonádicas, sendo feita uma coleta por dia, durante 7 dias consecutivos, de acordo com o preconizado por Pickett (1993). As coletas foram feitas com o uso de vagina artificial modelo Botucatu¹, previamente preenchida com água aquecida a 50 °C e revestida com uma mucosa plástica descartável lubrificada com vaselina esterilizada. O ejaculado foi coletado em saco plástico dentro de um copo coletor, com proteção da luz e das variações de temperatura. Em todas as coletas, foi utilizada uma égua em estro natural ou induzido (20 mg de cipionato de estradiol²) devidamente contida, para proteção dos garanhões.

¹ Biotech Ltda, Botucatu, Brasil.

² ECP® – Pfizer Saúde Animal, SP, Brasil

3.5. Análise seminal

Após a coleta, o volume total de sêmen foi mensurado em proveta graduada previamente aquecida. Em seguida, o material foi filtrado em filtro de nylon para retirada do gel e mantido em banho maria a 37 °C. Da amostra obtida, foi realizada a análise de motilidade total, vigor, concentração espermática, total de espermatozóides no ejaculado, morfologia espermática e a integridade de membrana plasmática que foi feito por meio do uso de sondas epifluorescentes (Iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína), teste supravital (eosina-negrosina) e teste hipoosmótico.

A motilidade espermática total (0 a 100%) e o vigor espermático (0 a 5) foram analisados por meio de uma amostra de 20 µL de sêmen colocada entre lâmina e lamínula e analisada sob microscopia de contraste de fase, em aumento de 200x, pelo método “duplo-cego”. Os materiais utilizados (ponteiras, lâminas e lamínulas) foram previamente aquecidos em mesa aquecedora a 37 °C.

A concentração espermática foi determinada com auxílio de câmara de Neubauer. Uma amostra de 50 µL foi diluída em 950 µL de uma solução de formol salina tamponado (anexo 1), perfazendo uma diluição de 1:20. Após homogeneização, uma alíquota foi colocada nos dois compartimentos da câmara, até seu preenchimento. Após cinco minutos, foi feita a leitura, em microscópio óptico, de cinco quadrados em diagonal, cada quadrado contendo 16 quadrados menores. Esse procedimento foi realizado nos dois compartimentos e sua média aritmética foi multiplicada por 10⁶ para determinar a concentração de espermatozóides por mL (CBRA, 1998). Caso a diferença entre o número de espermatozóides entre os dois lados da câmara fosse maior que 10%, o procedimento foi repetido. O número total de espermatozóides foi obtido multiplicando-se o volume do ejaculado sem gel pela concentração espermática encontrada.

Para a realização do exame morfológico dos espermatozóides, uma amostra de sêmen foi adicionada à 1 mL de solução de formol salina tamponada, até seu turvamento. Então, foi realizada uma preparação úmida analisada sob microscopia óptica com aumento de 1000x, em óleo de imersão, sendo contadas 200 células. A análise foi realizada baseando-se na quantidade de patologias, de acordo com Blom

(1973) e preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais.

A integridade da membrana plasmática, avaliada por sondas epifluorescentes, foi realizado conforme descrito por Harrison e Vickers (1990) e adaptado por Zúccari (1998) (anexo 2). Uma alíquota de 20 μ L de sêmen foi retirada e homogeneizada com 80 μ L da solução contendo iodeto de propídeo (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) previamente aquecida a 37° C em banho maria. A mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos em sala escura. Em seguida, uma gota da mistura foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de epifluorescência, com filtro de 480, em aumento de 1250x e sob óleo de imersão. Foram avaliadas 100 células, sendo classificadas em três categorias diferentes: células com membrana plasmática íntegra, aquelas que se apresentavam coradas em verde (pelo iodeto de propídeo); células lesadas, aquelas coradas em vermelho (pela CFDA); e células semi lesadas aquelas que se apresentavam vermelhas na região acrossomal e verde na região do núcleo.

A análise da integridade estrutural de membrana plasmática foi realizada pela coloração de eosina e negrosina, a 1 e 5% respectivamente (SWANSON E BEARDEN, 1951), por meio de esfregaço seminal, onde uma gota de sêmen foi adicionada a uma gota do corante. Após 30 segundos, a lâmina foi analisada em microscopia óptica, em aumento de 1000x sob óleo de imersão. Foram contabilizadas 100 células, sendo considerados como “espermatozóides não viáveis” aqueles em que sua cabeça foi corada de rosa, e como “espermatozóides viáveis” aqueles em que sua cabeça permanecia não corada.

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico, de acordo com Alves et. al, (2005). Em um tubo plástico de 1,5 mL (eppendorff), foi adicionado 800 μ L de água destilada sendo esta aquecida em banho maria a 37° C. Em seguida, foi adicionado 100 μ L da amostra a ser analisada e incubada a 37° C por quinze minutos. Então, foi realizada a fixação da amostra com 0,5 mL de solução de formol salina tamponado para preservação da amostra. A análise foi realizada em microscopia de contraste de fase, em aumento de 1000x, sob óleo de imersão. Foram contabilizadas 200 células, sendo consideradas reativas ao teste aquelas que apresentavam dobra ou enrolamento da cauda espermática. Da porcentagem final de células reativas, foi subtraída a porcentagem de espermatozóides com calda dobrada

encontrados no teste morfológico, sendo o resultado, a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (MELO & HENRY, 1999).

3.6. Análises Bioquímicas

Ao final das avaliações físicas do sêmen e a retirada das amostras para os exames complementares, o restante do ejaculado foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 700 g por 20 minutos a 4 °C para que o plasma seminal fosse separado dos espermatozoides. O sobrenadante foi retirado e armazenado em tubos de plástico de 1,5 mL (Eppendorff) e estocado em ultrafreezer a -80 °C.

3.6.1. Proteína Total do plasma seminal

As amostras de plasma seminal de cada garanhão (26 ejaculados) foram divididas em 13 pools, sendo agrupadas de duas em duas amostras subseqüentes, seguindo a data de suas coletas. Cada pool contendo 500 µL de plasma de cada ejaculado. Os pools submetido à centrifugação em microcentrífuga resfriada a 10.000 g por 10 minutos, a 4 °C, seguido por uma segunda centrifugação sob mesma temperatura, a 20.100 g por 30 minutos para a clarificação das amostras.

Para a análise da quantidade total de proteínas, foram utilizados dois métodos: método de Bradford (1976) e o método do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH et al., 1985).

Na realização do método de Bradford, primeiramente foi determinada uma curva padrão, utilizando albumina sérica bovina (BSA) e o corante Comassie Brilliant Blue G – 250¹. Quantidades conhecidas da proteína padrão (BSA) foram homogeneizadas com 160 µL do reagente de Bradford a 125%. Para que se obtivesse um volume final de 200 µL, o restante foi completado com água mili-Q. A mistura foi deixada para reagir em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, foi colocada em microplaca para leitura de sua absorbância. Além das proteínas de concentração previamente conhecida, uma triplicata foi realizada utilizando apenas água destilada (branco). Do resultado obtido, foi feita a média da absorbância das três leituras e subtraído a média da leitura do branco e da leitura da placa vazia. Dos valores apresentados, obteve-se a equação

ajustada apresentada na figura 1. Para a obtenção das concentrações de proteína do plasma seminal, o procedimento foi igual ao da obtenção da curva, sendo o resultado baseado na equação ($\hat{Y} = 0,163 + 0,040 X$).

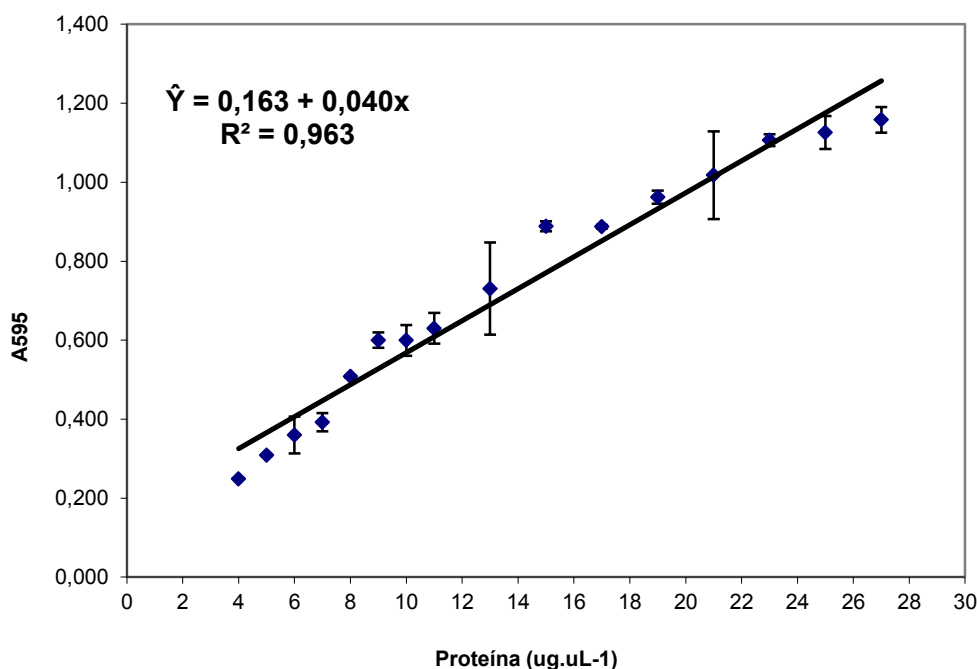


Figura 1: Curva padrão obtida pelo método de Bradford (1976) para mensuração das concentrações protéicas do plasma seminal de eqüinos.

Para a quantificação pelo método do ácido bicinconínico (BCA), foi determinada uma curva padrão, utilizando quantidades conhecidas de BSA. Primeiro, foram pipetadas as amostras de BSA, mantidas em banho de gelo. Em seguida, foi pipetado 1000 μ L de solução trabalho (anexo 3). Para que o volume final fosse 1050 μ L, foi adicionada água mili-Q. Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 37 °C, um a um, em um intervalo de 30 segundos, durante 30 minutos. Os tubos foram retirados da mesma forma e deixados a temperatura ambiente (20 °C) por vinte minutos. A leitura foi feita em intervalos de 30 segundos entre cada amostra em espectrofotômetro, em absorbância de 562 nm. Do resultado, se obteve a equação demonstrada na figura 2. Para a determinação da concentração de proteínas nas

amostras de plasma, foi realizado o mesmo procedimento, sendo o resultado das absorvâncias aplicado na equação ($\hat{Y} = 0,053 + 0,014 X$).

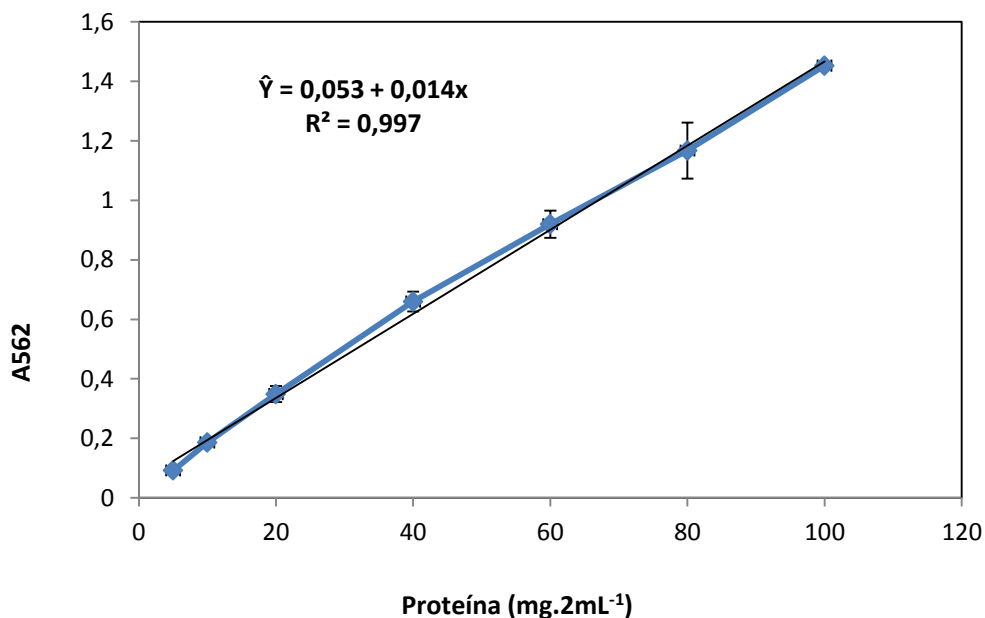


Figura 2: Curva padrão obtida pelo método do ácido bicinconínico (Smith et al, 1985) para mensuração das concentrações de proteínas do plasma seminal de equinos.

3.6.2. Colesterol total do plasma seminal

A análise da concentração de colesterol total das amostras de plasma seminal foi realizada por teste enzimático colorimétrico, por meio de kit da Bioclin para colesterol monoreagente.

3.6.3. Glicose do plasma seminal

A análise da concentração de glicose das amostras do plasma seminal também foi realizada por teste enzimático colorimétrico, por meio de kit comercial da Bioclin para glicose monoreagente.

3.6.4. Identificação das proteínas do Plasma Seminal

Após a clarificação do plasma seminal em microcentrífuga, foi realizado um novo pool das amostras, desta vez separadas de acordo com a estação bioclimática em que foram coletadas, sendo analisadas individualmente para cada garanhão: primavera (29 de setembro de 2009 a 8 de dezembro de 2009); verão (21 de dezembro de 2009 a 16 de março de 2010); outono (29 de abril de 2009 a 8 de junho de 2009 e 30 de março a 14 de abril de 2010) e inverno (22 de junho de 2009 a 26 de setembro de 2009). As amostras foram submetidas ao método de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida para identificação de seu ponto isoelétrico e sua massa molecular, segundo protocolo de Novak et. al. (2010) modificado.

As proteínas foram separadas quanto seu ponto isoelétrico, por meio de focalização isoelétrica, com auxílio do sistema Ettan IPGphor 3³ em fitas de 24 cm e gradiente de pH entre 3 e 10. Em cada fita, foi aplicado 500 µg de proteína. Um volume final de 450 µL foi estabelecido como padrão para todas as fitas, sendo esse volume composto de : amostra de plasma seminal, solução de reidratação (anexo 4), solução Destreak³ e IPG buffer³. O volume de amostra foi determinado pela concentração obtida no teste do ácido bicinconínico e o IPG buffer foi fixado em 2,5% do volume total, conforme recomendações do fabricante. O volume restante foi composto de 50% de solução de reidratação e 50% de Destreak. As fitas foram deixadas na solução por 12 horas. Em seguida, foi realizada a focalização isoelétrica. Primeiramente, as fitas foram submetidas a 200 v de voltagem, por 10 h, seguido de 500 v por 1 h para que pudesse ocorrer a separação paralela das proteínas sem interferência dos sais presentes. Em seguida, foi aplicada uma corrente gradativa de 800v/h até que completasse 1000 volts. Depois, 16500v/h foram aplicados de forma gradativa até completar 10000v. Finalmente, 27000v/h foram aplicados de forma brusca, até que se completasse 10000v. A amperagem foi fixada em 75 µA por fita e a temperatura foi de 20 °C.

Após a focalização isoelétrica, as fitas foram equilibradas em solução de equilíbrio (anexo 5), primeiro contendo 1% de ditiotreitol (DTT) e depois com 2,5% de iodoacetamida. Em seguida, foram fixadas em gel de poliacrilamida a 12,5% (anexo 6)

³ GE Healthcare

preparados no dia anterior, para evitar que a acrilamida não polimerizada reagisse com alguma proteína. Em cada gel, foi colocado um pedaço de papel de 5 X 5 mm contendo 15 µL de um marcador de peso molecular conhecido. As fitas contendo as amostras já separadas pelo ponto isoelétrico foram então submetidas ao sistema Ettan Dalt Six³ para separação das proteínas pelo peso molecular. Tal processo foi realizado em duas etapas : o primeiro em baixa amperagem (10 mA) para que as proteínas fossem forçadas a saírem da fita e entrar no gel ; a segunda, em alta amperagem (40 mA) para que as proteínas se deslocassem pelo gel. Todo o processo foi realizado a 10 °C para evitar superaquecimento do sistema. Quando o corante chegava no limite inferior das placas, o sistema foi desligado e os géis foram colocados em uma solução fixadora (ácido acético 10% e etanol 40%) durante toda a noite.

Após fixação, as proteínas foram coradas com comassie coloidal, conforme protocolo de Neuhoﬀ et al (1988) modificado.

Em seguida, os géis foram lavados com água destilada e estocados em solução de ácido acético a 5%, até que fossem escaneados com auxílio do equipamento ImageScan³. As imagens obtidas foram analisadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6.0³.

3.7. Perfil sérico de testosterona e cortisol

A determinação das concentrações de cortisol e testosterona sanguíneos foram realizados pela punção da veia jugular de cada garanhão. As coletas foram realizadas ao longo de um período de 24 h, em intervalos de 20 minutos entre cada coleta, uma vez a cada estação bioclimática (22 de maio de 2009; 21 de agosto de 2009; 20 de novembro de 2009; e 19 de fevereiro de 2010), perfazendo 73 amostras por animal em cada estação, totalizando 876 amostras.

Previamente a cada coleta, os animais tinham sua veia jugular canulada para facilitar a punção sanguínea, com cateter de calibre 14. Para evitar que o catéter ficasse obstruído por coágulos sanguíneos, os mesmos foram lavados com solução de heparina após cada coleta, na proporção de 1:1000. Antes de cada punção, um volume de 1 mL de sangue foi descartado para evitar que a heparina interferisse no teste.

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 330 g por 10 minutos para separação do soro sanguíneo. O mesmo foi retirado e acondicionado em tubos de plástico de 1,5 mL (eppendorff) em duplicata, e congelado a -20 °C para que fosse analisado posteriormente.

As análises foram realizadas com uso de kit de reagentes comerciais, no aparelho Acess, pela técnica de quimioluminescência, conforme especificações do fabricante.

3.8. Análise Estatística

Para avaliação dos dados foi empregado o programa estatístico SAEG – 9.1 (SAEG – UFV, 2007).

Todas as características estudadas (aspectos físicos e morfológicos do sêmen, testes complementares, quantificação das proteínas, colesterol, glicose, testosterona e cortisol) foram analisadas por estatística descritiva (média e desvio-padrão). Para analisar a identificação protéica foi empregado somente a descrição das proteínas obtidas.

Para todas as características quantitativas, os dados foram submetidos aos testes de Lilliefors e Bartlett e Cochran para verificar a normalidade dos dados e a homocedacidade das variáveis respectivamente, e, naquelas que se mostraram positivas aos testes, os dados foram submetidos a ANOVA. Quando se mostraram significativas pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Esta análise foi realizada tanto dentro de cada estação como também entre as estações do ano. Para aqueles dados que não atenderam às premissas da ANOVA, os mesmos foram submetidos a análise não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis. O mesmo procedimento foi empregado na análise de quantificação de proteína total, pelos dois métodos empregados, porém as médias foram comparadas pelo teste F (paramétrico) ou pelo teste de Will Coxon (não paramétrico).

O comportamento de todos os dados quantitativos foram estudados dentro e ao longo das estações pela análise de regressão.

A correlação simples de Pearson foi realizada entre todas as características estudadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se analisar os parâmetros físicos do sêmen dos animais durante as quatro estações (tabela 1), foi mostrado que durante a estação de monta (primavera e verão), houve um maior volume de sêmen e menor concentração espermática por mL ($p < 0,05$), especialmente no período de verão, ápice da estação reprodutiva. Apesar dessa diferença no volume, a quantidade de espermatozóides total manteve-se similar às demais estações. Essa diferença de volume pode ser atribuída a um maior estímulo sexual dos garanhões induzidos pelas éguas em estro, durante o período reprodutivo. Esses resultados corroboram com os achados de Nishikawa (1959) e Picket et al. (1970, 1975 e 1976). Os últimos autores demonstraram que a sazonalidade afeta mais a produção do plasma seminal dos garanhões do que sua produção espermática.

Em um estudo realizado na mesma localidade, porém em jumentos (Gastal et. al., 1996), não observaram diferença no volume de ejaculado sem gel entre as estações. De acordo com os autores, isso provavelmente ocorreu devido à localização geográfica que apresenta pouca variação climática e de fotoperíodo. Porém, tem-se que levar em consideração que o tempo de corte na espécie asinina é maior que em garanhões, resultando em ejaculados com mesmo volume.

A motilidade diferiu entre as estações de inverno e primavera/verão e também entre a primavera e outono/inverno. Tal achado pode estar correlacionado à variação do ITGU entre a estação reprodutiva (primavera e verão) e o período de dias curtos (outono e inverno).

Quanto ao vigor e defeitos espermáticos não foi observada diferença nos valores médios nas estações bioclimáticas ($p > 0,05$).

No presente estudo, foi observada diferença ($p < 0,05$) entre os parâmetros climatológicos para a estação reprodutiva (primavera e verão) e o período de repouso sexual (outono e inverno) (Tabela 2), onde tanto nas baias quanto nos piquetes, o ITGU apresentou diferença entre os dois períodos de análise. Tais diferenças também ocorreram na intensidade luminosa apresentada pelo luxímetro. Apesar de não haver citação na literatura, no presente estudo foi verificada correlação entre as médias de intensidade luminosa e a quantidade de gel no ejaculado ($r = 0,5008$).

Tabela 1: Parâmetros físicos do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações do ano.

Características Seminais	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
Sêmen com Gel (mL)	41,17 ± 22,14 a	40,86 ± 19,01 ac	67,17 ± 27,26 bd	110,33 ± 43,87 be
Sêmen filtrado (mL)	35,89 ± 22,52 C	38,26 ± 18,39 BC	54,28 ± 25,30 B	72,00 ± 22,91 A
Concentração (10⁶sptz/mL)	316,44 ± 201,19 a	358,73 ± 180,55 a	178,86 ± 97,02 b	193,48 ± 106, 27 b
Número de sptz no ejaculado (10⁹)	9,6 ± 7,2 A	13,7 ± 9,7 A	9,0 ± 5,5 A	12,8 ± 6,5 A
Motilidade	74,72 ± 8,82 AB	74,52 ± 5,90 A	66,39 ± 8,88 C	67,86 ± 6,99 BC
Vigor	3,28 ± 0,52 A	3,19 ± 0,70 A	3,17 ± 0,38 A	3,43 ± 0,51 A
Defeitos Maiores	22,59 ± 6,44 A	25,48 ± 9,06 A	22,83 ± 9,83 A	24,14 ± 9,17 A
Defeitos Menores	7,94 ± 3,49 A	7,05 ± 5,40 A	6,00 ± 6,02 A	6,90 ± 4,83 A
Defeitos Totais	30,53 ± 7,51 A	32,52 ± 11,63 A	28,83 ± 12,52 A	31,05 ± 11,40 A

a...c Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

A..C Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05), pelo Teste de Tukey

Segundo Hahn e Marder (1997), um ambiente com um índice de 72 a 78 (ITGU) é o ambiente térmico ideal para bovinos. Para Encarnação (1989), um ambiente com índice de temperatura e umidade (ITU) igual a 70 é o ideal para os diversos tipos de animais domésticos. De acordo com Ribeiro (2009), o ITGU e o ITU são parâmetros que podem ser utilizados para classificar um ambiente térmico, não havendo diferença entre si. O autor demonstrou que mesmo sob condições de ITGU muito elevadas,

chegando a 87,5 unidades, os animais não apresentaram alterações em seus batimentos cardíacos ou frequência respiratória. No presente estudo, avaliou-se as concentrações de cortisol na corrente sanguínea, como parâmetro para predizer se os animais sofreram algum tipo de estresse calórico. De acordo com Hoffsis et al. (1970) o valor médio de cortisol no plasma de eqüinos adultos hígidos é 5,12 µg/100 mL. Os valores médios de cortisol registrados para os três garanhões demonstram que os mesmos, nas condições de ambiente no qual foram manejados, não se encontravam em condição de estresse (Tabela 2).

TABELA 2: Média do Índice de Globo e Umidade (ITGU) em duas miniestações climáticas no setor de Equideocultura da UFV, intensidade luminosa e os níveis séricos de cortisol de 29/04/2009 a 14/04/2010.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão
ITGU (baia)	75,37 ± 3,33 B	72,77 ± 4,14 B	79,54 ± 3,96 A	82,14 ± 4,86 A
ITGU (piquete)	69,47 ± 2,88 B	66,62 ± 2,34 B	74,92 ± 2,81 A	76,94 ± 3,15 A
Luxímetro* (piquete)	753,7 ± 3,33 B	727,7 ± 4,14 B	795,4 ± 3,96 A	821,4 ± 4,86 A
Luxímetro* (baia)	13,20 ± 3,40 B	9,98 ± 4,45 B	15,81 ± 7,86 AB	22,38 ± 8,94 A
cortisol (uL/dL)	2,48 ± 0,98 a	2,70 ± 0,89 a	2,76 ± 1,20 a	2,17 ± 0,90 b

A..C Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05), pelo Teste de Tukey

^{a, b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05), pelo Teste de Kruskal Wallis;

* valores em Lux

Quanto ao método de determinação das concentrações de proteínas, ambos se baseiam na formação de compostos coloridos devido às reações de certos grupos ou radicais da molécula de proteína com reagentes químicos específicos. A sensibilidade entre os métodos varia e este fator pode ser determinante na escolha de qual será utilizado. Ao comparar o método de Bradford com o método do Ácido Bicinonínico, verifica-se que, para o primeiro método, as concentrações de proteínas solúveis não

diferiram ($p > 0,05$) entre as estações (Tabela 3). De acordo com Zaia et al. (1998), esse método não detecta pequenos peptídeos e aminoácidos livres, que estariam presentes nas amostras de sêmen e poderiam ser responsáveis pela proteção dos espermatozoides, ao se incorporarem na membrana plasmática dos mesmos. . Quando se analisou as concentrações pelo método do Ácido Bicinconínico, verificou-se maior concentração dessas proteínas solúveis no período de outono que no verão ($p < 0,05$), assim como, maior ($p < 0,05$) número de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, pelo método de epifluorescência (Tabela 4). Metz et al. (1990) sugeriram que as proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal são importantes para a manutenção da viabilidade dos espermatozoides por serem mais facilmente adsorvidas pela membrana destas células. Apesar das diferenças, houve uma grande correlação entre os dois testes ($r = 0,73$).

Por outro lado, alguns autores afirmaram que proteínas de baixo peso molecular (menores que 14 kDa) causam redução da motilidade espermática e da congelabilidade dos gametas em touros, sendo este efeito, dependente da concentração dessas proteínas no plasma seminal (Garcia & Graham, 1987; Al-Somai et al., 1994).

TABELA 3: Concentração de proteínas no plasma seminal de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações bioclimáticas por dois métodos bioquímicos distintos.

Método Bioquímico	Outono	Inverno	Primavera	Verão
BCA* (mg/mL)	15,72 ± 10,68 a	11,73 ± 9,06 bc	11,48 ± 5,17 ac	11,43 ± 8,05 bc
Bradford (mg/mL)	14,33 ± 6,77 A	12,25 ± 7,27 A	15,92 ± 4,47 A	12,34 ± 7,01 A

a...c Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

A..C Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey

*Ácido Bicinconínico

TABELA 4: Integridade de membrana plasmática de espermatozóides de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações do ano, analisado pelo teste de epifluorescência.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Lesados	35,80 ± 21,86 B	36,71 ± 20,57 AB	52,22 ± 20,47 A	55,22 ± 19,06 A
Semilesados	3,20 ± 6,07 A	2,52 ± 5,18 A	2,06 ± 5,36 A	2,65 ± 3,89 A
Íntegros	61,00 ± 21,59 A	60,76 ± 19,29 AB	45,72 ± 20,45 B	42,83 ± 18,87 B

A..C Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey

A concentração total das proteínas solúveis do plasma também apresentou correlação, apesar de baixa (0,362), com a produção total de espermatozóides em cada ejaculado. Isso pode ocorrer numa tentativa do epidídimo em suprir os espermatozóides produzidos com substrato necessário para que o máximo possível de espermatozóides esteja embebido em tais proteínas, seja para a proteção de sua membrana plasmática ou para sua capacitação posteriormente, nos órgãos femininos. Tais observações são respaldadas pelo fato de não se ter encontrado correlação entre a concentração total de proteínas e o volume de sêmen produzido. Porém, tais observações não corroboram com os estudos de Novak et al. (2009) que verificaram uma correlação negativa entre estas características em estudo de plasma seminal de suínos considerados férteis.

Gerlach e Aurich (2000) relataram que a atividade reprodutiva sazonal é regulada por um ritmo endógeno e que este ritmo é ditado pelos estímulos ambientais, sendo o fotoperíodo o mais importante deles. Outras características ambientais como disponibilidade de alimento, índice pluviométrico e temperatura não influenciariam de forma tão direta. Corroborando, Roncoletta et al. (1997) relataram que a produção das proteínas do plasma seminal pode estar relacionada a sazonalidade da espécie. Pickett et al. (1976) e Amann (1993) observaram que as variações nas concentrações de testosterona relacionam-se a desordens reprodutivas, visto que esse hormônio é o responsável pela maturação dos espermatozóides e estimulação na produção de algumas proteínas presentes no plasma seminal.

No gráfico 1, pode-se verificar que não houve correlação entre a concentração de proteínas solúveis no plasma seminal e as concentrações de testosterona no plasma sanguíneo dos garanhões no presente estudo ($p>0,05$).

A motilidade espermática é utilizada a campo como método para estimar o potencial fecundante do sêmen de um reprodutor. Samper et al. (1991) e Jasko (1992) verificaram correlação positiva entre a motilidade espermática do sêmen e a fertilidade de garanhões. No entanto, no presente estudo, não se registrou correlação entre a motilidade espermática e a concentração de proteínas solúveis no plasma seminal, sendo observada uma correlação entre o número de espermatozoides com membrana plasmática lesada e a concentração de proteínas solúveis, pelo método do ácido Bicinconínico, embora uma baixa correlação.

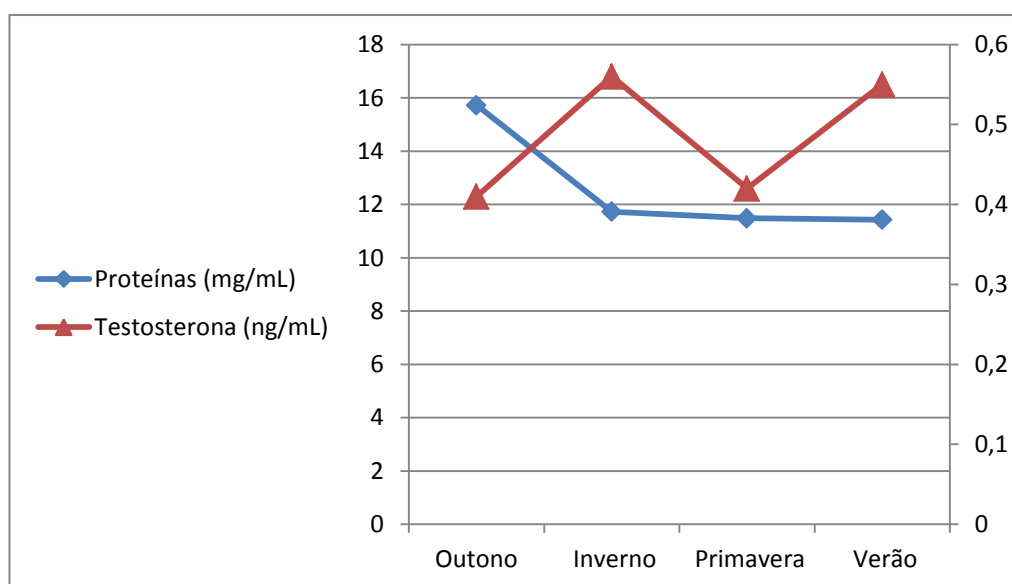


Figura 3: Relação entre a concentração de proteínas do plasma seminal e a concentração sérica de testosterona em garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações bioclimáticas.

Quanto ao perfil de proteínas solúveis, foi verificada uma variação grande entre os três indivíduos analisados. Na tabela 5, estão sumariados a massa molecular (MW) e o ponto isoelétrico (pI) das proteínas comuns aos três garanhões do presente estudo. Foram identificadas 10 proteínas consideradas comuns aos animais em estudo, sendo

que três apareceram em todas as estações (4, 7 e 11 KDa), uma apenas no outono (18 KDa), duas na primavera (22 e 35 KDa), três no verão (20, 27 e 29 KDa) e uma nos períodos de outono, inverno e primavera (9 KDa). Tais registros demonstram grande variação quanto a síntese de determinadas proteínas ao longo das estações bioclimáticas, sendo comum a todos os animais do presente estudo.

Provavelmente, a produção protéica não se correlacionou dentre os animais pela variação individual na expressão de algumas proteínas.

Tabela 5: Massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas do plasma seminal de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das quatro estações do ano, determinados por eletroforese bidimensional.

Estação bioclimática	Massa Molecular* (kDa)	Ponto Isoelétrico
Outono	18	9,1
Primavera	22	6,7
	35	7,2
Verão	20	8,2
	27	8,0
	29	7,5
Outono, Inverno e Primavera	9	9,0
Todas estações	4	5,8
	7	7
	11	7,5

*massa molecular com valores aproximados.

De acordo com Blottner (2001) a qualidade do sêmen sofre maior variação devido as características intrínsecas do garanhão do que as estações bioclimática. Tais observações são corroboradas pelo presente estudo, onde os garanhões apresentaram um perfil bem distinto de proteínas solúveis.

É importante ressaltar que, mesmo não havendo uma correlação entre a presença de algumas proteínas, a motilidade espermática, a morfologia espermática e a integridade de membrana no presente estudo, alguns autores relacionaram a presença ou ausência de alguns polipeptídeos à congelabilidade dos espermatozoides (Pangawkar et al., 1988; Dhami e Kodagali, 1989; Roncoletta, 1999; Pacheco, 2002).

Na tabela 6 estão sumariados os dados das proteínas em maior quantidade, presentes no plasma seminal dos três garanhões analisados.

TABELA 6: Massa molecular, ponto isoeletrico e volume proporcional das proteínas solúveis com maior frequência no plasma seminal de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, ao longo das estações do ano

ESTAÇÃO BIOCLIMÁTICA	ANIMAL 1			ANIMAL 2			ANIMAL 3		
	MM ¹	pI ²	Vol(%)	MM	pI	Vol (%)	MM	pI	Vol (%)
E1, E2, E3 e E4 ³	4	5,76	1,14	11	7,49	1,23	13	9,96	1,19
	29	7,05	1,54	9	7,54	2,76	13	9,96	1,20
	8	7,56	1,62	11	7,02	2,53	18	7,57	1,34
	4	8,34	1,91	8	6,02	13,78	47	7,1	1,53
	30	6,97	2,70	-	-	-	7	6,99	1,84
	8	7,00	3,28	-	-	-	16	8,59	1,87
	3	9,12	8,14	-	-	-	13	9,55	2,12
	7	4,85	8,92	-	-	-	17	9,11	2,25
	8	5,21	8,08	-	-	-	21	7,57	2,76
	8	7,18	16,46	-	-	-	19	9,43	2,97
	8	6,99	6,16	-	-	-	19	9,32	3,26
	11	7,37	7,51	-	-	-	13	9,78	5,87
	-	-	-	-	-	-	16	9,46	6,54
	-	-	-	-	-	-	17	10	7,79
	-	-	-	-	-	-	18	7,35	7,21
	-	-	-	-	-	-	20	7,78	8,22
	-	-	-	-	-	-	7	6,5	8,51
	-	-	-	-	-	-	16	9,72	9,29
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	-	-	-	7	4,36	10,61	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-	24	9,62	1,17
	-	-	-	-	-	-	21	6,09	1,83
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	-	-	-	7	7,57	1,95	-	-	-
	-	-	-	6	4,62	13,07	-	-	-

E1 e E4	15	8,21	1,70	-	-	-	-	-	-
	7	6,88	2,64	-	-	-	-	-	-
E1, E2 e E3	-	-	-	8	9,23	3,53	-	-	-
E1, E2 e E4	-	-	-	9	9,69	13,20	-	-	-
	-	-	-	9	8,96	20,14	-	-	-
E2, E3 e E4	14	4,73	4,11	-	-	-	-	-	-

¹Massa Molecular (kDa) ²Ponto isoelétrico ³E1 Outono; E2 Inverno; E3 Primavera; E4 Verão

No presente estudo, os garanhões apresentaram um perfil protéico bem diferenciado entre si. Algumas proteínas apareceram em maior quantidade que as demais (tab. 6). É possível visualizar que a maioria das proteínas solúveis observadas possuem peso molecular abaixo de 30 kDa. Miller et al. (1990) descreveu um grupo de proteínas do plasma seminal com massa molecular (MM) variando de 15 a 17 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 4,1 a 6, sendo estas associadas a integridade de membrana plasmática. 4,11% das proteínas verificada no animal 1 são semelhantes com as observadas pelos autores, apesar de não terem correlação com a fertilidade do animal em questão (14 kDa; pI= 4,73).

Conforme ocorrido no presente estudo, Araújo et al. (2005) verificaram uma grande variação individual na expressão de proteínas de três ejaculados de três garanhões, sendo registrado de 9 a 26 bandas nas amostras de plasma seminal, aparecendo uma banda bem representativa de 20-23 kDa em todas as amostras..

Em estudo avaliando as proteínas do plasma seminal de garanhões por eletroforese bidimensional, foram encontradas 17 bandas protéicas com MM variando de 10 a 80 kDa e ponto isoelétrico entre 3,2 e 8,2 sendo que 10 estavam presentes em todos os animais, duas não foram detectadas nos animais considerados de baixa qualidade seminal e apenas uma foi superior nos animais de alta qualidade seminal (Jobim et al., 2003). Tais achados se assemelham aos encontrados no presente estudo (Tabela 5 e 6).

Inagaki et al. (2002) isolaram uma proteína no plasma seminal dos eqüinos conhecida como lactoferrina. Acredita-se que seja um componente bactericida, ajudando a manter o ambiente uterino livre de patógenos pós coitais. Esse tipo de proteína influenciaria as taxas de prenhez de determinado garanhão sem que houvesse influência nos parâmetros físicos e morfológicos dos espermatozoides, atualmente utilizados para predizer o potencial reprodutivo de um reprodutor. Isso explicaria a

presença ou ausência de determinadas proteínas no plasma seminal de um garanhão, sem que houvesse alteração aparente nas características físicas e morfológicas dos espermatozóides.

Brandon et al. (1999) observaram algumas proteínas correlacionadas negativamente a fertilidade (75 kDa, pI 6,0; 18 kDa, pI 4,3 e 16 kDa, pI 6,5) e uma banda positivamente correlacionada (72 kDa, pI 5,6). No presente estudo, nenhuma das proteínas encontradas pode ser relacionada aos achados deste pesquisador.

Em um estudo realizado por Zahn (2006) foram observadas 29 bandas protéicas, com massas moleculares variando de 170,9 a 10,9 kDa. Destas, apenas sete estavam presentes em todos os animais avaliados (170,9; 75,1; 62,2; 54,5; 24,8; 19,5 e 15 kDa), semelhante ao estudo de Amann et al. (1987) que observou 27 bandas protéicas e ao presente estudo (tabela 5 e 6). Da mesma forma que Zahn, a maioria das proteínas verificadas no presente estudo apresentaram baixa massa molecular (<30 kDa; tab. 6). Fraser e Bucci (1996) identificaram apenas 14 bandas, utilizando gel de poliacrilamida a 15%. O autor justifica que o uso de poucas quantidades de proteínas na análise por eletroforese bidimensional possa ter feito com que apenas as proteínas em maior abundância fossem detectadas, sendo possível que o mesmo tenha ocorrido no presente estudo.

Na tabela 7 estão sumariados os valores médios das concentrações de glicose e colesterol ao longo das estações do ano. Houve diferença nos valores médios da concentração de glicose entre as estações bioclimáticas ($p < 0,05$). Não houve correlação entre as concentrações de glicose e a sazonalidade ou qualquer outra característica seminal estudada ($p > 0,05$). As concentrações de glicose no plasma seminal se mostraram mais baixas àquelas registradas por Amann e Graham (1993).

As concentrações de colesterol apresentaram uma diferença nítida entre as estações ($p < 0,05$). Porém, essa característica não apresentou correlação com nenhuma outra característica estudada, exceto com as concentrações de cortisol sanguíneo ($r = -0,4981$). Zahn (2006) não verificou diferença entre as concentrações de glicose e colesterol no plasma seminal e a congelabilidade do sêmen dos garanhões. Apesar de não haver correlação do colesterol com as outras características, Câmara et al. (2005) verificaram correlação da concentração de colesterol no plasma seminal com a congelabilidade de sêmen de carneiros. No entanto, no presente estudo, não se pode

inferir tal relação por não se ter analisado a congelabilidade dos três garanhões estudados.

TABELA 7: Concentração de glicose e de colesterol no plasma seminal de garanhões Mangalarga Marchador ao longo das estações bioclimáticas.

	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Glicose (mg/dL)	26,21 ± 20,44 AB	15,43 ± 14,34 B	33,37 ± 17,91 A	39,97 ± 15,12 A
Colesterol (mg/dL)	10,17 ± 11,20 D	8,00 ± 2,05 C	14,5 ± 1,76 B	21,00 ± 2,05 A

A..C Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey

a...c Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

5. CONCLUSÃO

- a concentração de proteínas no plasma seminal correlacionou à integridade de membrana espermática
- os únicos componentes bioquímicos estudados que sofreram variação sazonal foram o colesterol e a glicose do plasma seminal e a concentração das proteínas solúveis;
- a sazonalidade teve influência sobre o volume de sêmen com gel, a concentração e a motilidade espermática;
- a variação sazonal da testosterona não teve influência sobre os parâmetros bioquímicos do sêmen;
- houve diferença entre os dois tipos de métodos colorimétricos para determinação das proteínas solúveis do plasma seminal.
- foram encontradas proteínas distintas no plasma seminal dos garanhões Mangalarga Marchador, sendo que 10 foram comuns aos três machos estudados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, I.S. Respostas termorreguladoras, armazenamento de calor corporal e produção de leite de vacas holandesas mantidas ao sol e com acesso a sombra natural. Botucatu, 1999, 76p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

ALGHAMDI, A.S., TROEDSSON, M.H., XUE, J.L., CRABO, B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. **Am. J. Vet. Res.** v63, p880–885. 2002.

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; MOLAN, P.C. Low molecular weight components in bovine semen and their effects motility of bull sperm. **Reproduction Fertility and Development.** v.6, p165-171. 1994

ALVES, S. G. G.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SNOECK, P. P. N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R. F.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; MELO, M. I. V.; HENRY, M. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen equino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 219-225. 2005.

AMANN RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology.** v10 p89-98. 1989

AMANN, R.P.; CRISTANELLI, M.J.; SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. **Journal of Reproduction Fertilite Suppl.** v 35 p 113-20. 1987

AMANN, R.P; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction.** Philadelphia: Lea&Febiger. 1993, p.715-745. 1992

AMANN, R. P. Physiology and Endocrinology. In: *McKINNON*, A. O.; VOSS, J. L. (Eds). **Equine reproduction.** Philadelphia: Lea and Febiger, 1993b. p. 658-685.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Practice**. v7, p145–173. 1987

ARAÚJO, E.B.; SOUZA, G.V.; SILVA, J.F.S.; FAGUNDES, B. Análise e caracterização do perfil protéico do plasma seminal e espermatozóides de eqüinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (Suppl. 1), p. 294, 2005

AUTIERO M, SANSONE G, AND ABRESCIA P. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology** v12 p191-120. 1991.

BAÊTA, F.C., SOUZA, C.F. **Ambiência em edificações rurais** – conforto animal. Viçosa: UFV, 1997. 246p.

BARONOS, S.; Seminal carbohydrate in boar and stallion. **Journal of Reproduction Fertility** v 24 p303-305. 1971

BATELLIER, F., VIDAMENT, M., FAUQUANT, J., DUCHAMP, G., ARNAUD, G., YVON, J.M., MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**. v68, p181–190. 2001

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 75-88. 2001.

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** v52, p863–873. 1999

BRAUN, J., SAKAI, M., HOCHI, S., OGURI, N. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. **Theriogenology** v41, p809–818. 1994

BUFFINGTON, C. S., COLLAZO-AROCHO, A., CANTON, G. H., PITY, D., TATCHER, E.E., COLLIDER, R.T. Black globe humidity confort index for dairy cows.

St. Joseph: American Society Agricultural Engineers, 19 p. (Paper, n. 77-4517). 1977

CANCEL, A.M., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**. v57, p1293–1301. 1997

COX, J. E.; REDHEAT, P. H.; JAWARD, N. M. A. The effect of artificial photoperiod at the end of the breeding season on plasma testosterone concentrations in stallions. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, p. 239-241. 1988.

CALVETE, J.J., NESSAU, S., MANN, K., SANZ, L., SIEME, H., KLUG, E., TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. **Reproduction of Domestic Animals**. v29, p411–426 1994.

CLAY, C.M., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., NEN, T.M. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone. **Journal of Animal Science**. v66, p.1246-1255. 1988

DAEL, P.F.; HUGHES, J.P. The normal estrous cycle. In MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. P.121-132

DHAMI, A. J.; KODAGALI, S.B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen from Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Science**. v57, n12 p1283-1286. 1989

HOFFMANN, B., LANDECK, A.. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science**. v57, p89–98. 1999

ENCARNACÃO, R.O. Estresse e produção animal: III – Algumas considerações zootécnicas. **Ciência e Cultura**, v.35, p.964-968, 1983.

ENCARNACÃO, R.O. Estresse e Produção Animal. In: **CICLO INTERNACIONAL DE PALESTRAS SOBRE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL**. 1989, Botucatu. *Anais...* Jaboticabal: FUNEP, p.111-129. 1989.

EKHLASI-HUNDRIESER, M., SCHAFER, B., KIRCHHOFF, C., HESS, O., BELLAIR, S., MULLER, P., TOPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction**. v70, p45–57. 2005.

ENGLE, C.E.; FOLEY, C.W.; WITHERSPOON, D.M.; SCARTH, R.D.; GOETSCH, D.D Influence of mare uterine tubal fluids on the metabolism of stallion sperm. **Am. J. Vet. Res.** v 8, p1149-1152. 1975

FRAZER, G.S., BUCCI, D.M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology** v46, p1389–1402. 1996b.

FRAZER, G.S., BUCCI, D.M. SDS-PAGE characterization of the proteins in equine seminal plasma. **Theriogenology**. v46, p579–591. 1996a.

FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A.; PLUCIENNICZAK, G.; KOTLOWSKA, M.; KORDAN, W.; WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G.; STRZEZEK, J. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reproductive Biology**, v.6, p.5-20, 2006.

GARCIA, M.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**. v24, p446-454. 1987

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatoz6ides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reprodução Animal**. 6ª ed. São Paulo: Manole, p. 167-190. 1995.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BECKER, A.R.; GASTAL, E.L. Effect of ejaculation frequency and season on donkey jack semen. **Theriogenology**. v47, p627-638. 1997

GEBAUER, M.R., PICKETT, B.W., FAULKNER, L.C., REMMENG, E.E., BERNDTSON, W.E. Reproductive physiology of the stallion. VII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. **Journal of Animal Science**. v43, p626–632. 1976.

GERLACH, T.; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in stallion, ram and hamster. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 197-213. 2000.

GIESE, A., JUDE, R., KUIPER, H., PIUMI, F., SCHAMBONY, A., GUERIN, G., DISTL, O., TOPFER-PETERSEN, E., LEEB, T. Molecular characterization of the equine *AEG1* locus. **Gene** v292, p65–72. 2002a

GIESE, A., JUDE, R., KUIPER, H., RAUDSEPP, T., PIUMI, F., SCHAMBONY, A., GUERIN, G., CHOWDHARY, B.P., DISTL, O., TOPFER-PETERSEN, E., LEEB, T. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (*TPX1*) and acidic epididymal glycoprotein 2 (*AEG2*) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Gene** v299, p101–109. 2002b

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. Wisconsin: Cross Plains. p642. 1992

GOOLSBY, H.A., BLANTON, J.R., COTTER, P.Z., PRIEN, S.D. Preliminary trial: motility comparisons of a unique freezing technology (UFT) to liquid nitrogen mist methodology for cryopreservation of porcine spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animals**. v39, p328–332. 2004.

GUILLAUME D. Photoperiod action on equine reproduction. **INRA Prod. Animal**. v9 p61–9. 1996

HAHN, G.L. Management and housing of farm animals in hot environments. In: YOSEF, M.K. **Stress physiology in livestock**. Boca Raton:: CRC PRESS, 1985. P151-174

HAHN, G.L.; MADER, T.L. Heat waves in relation to thermoregulation, feeding behavior and mortality of feedlot cattle. In: **5TH INTERNATIONAL LIVESTOCK ENVIRONMENT SYMPOSIUM MINNEAPOLIS**. St Joseph. *Anais...* St Joseph: ASAE, p. 563–567. 1997.

HARKEMA, W., BOYLE, M.S. Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa. In: **Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction**, v. 3, p. 1424–1426. 1992

HARRIS, J. M.; IRVINE, G. H. G.; EVANS, M. J. Seasonal changes in serum levels of FSH, LH and testosterone and in semen parameters in stallions. **Theriogenology**, v. 19, p. 311-321. 1982.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352. 1990.

HOFFMANN, B., LANDECK, A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science** v57, p89–98. 1999

HOFFSIS, G. F.; MURDICK, P. W.; THARAP, V. L.; AULT, K. Plasma concentrations of cortisol and corticosterone in normal horse. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 8, p. 1379-1387, 1970

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, p. 75-77, 2002.

INOUE, J., CERBITO, W.A., OGURI, N., MATSUZAWA, T., SATO, K. Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. **International Journal of Andrology**. v16, p155-158. 1993

JANETT, F.; THUN, R.; NIEDERER, K.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, v. 60, p. 453-461. 2003a

JASKO, D. J.; Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America – Equine Practice**. v8, p129-148. 1992

JASKO, D. J., LEIN, D. H. AND FOOTE, R. H. Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallion: 66 cases (1987–1988). **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v197, p389–394. 1990

JOBIM, M.I.M.; SMITT, F.L.; OBERST, E.R.; BRONZATTO, M.; KROTH, E.; SMIDERLE, W.; MATTOS, R.C. Perfil protéico do plasma seminal de garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.209-211, 2003.

JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biology of Reproduction**. v44, p284–291. 1991

JOHNSON, L., THOMPSON JR., D.L. Effect of seasonal changes in leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. **Journal of Reproduction Fertility**. v81, p227–232. 1987

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**. v107, p249-256. 2008

KELLY, C.F.; BOND, T.E. Bioclimatic factors and their measurement. **In: National Academy of Sciences: a guide to environmental research on animals**. Washington, 1971

MALSCHITZKY, E. **Estresse e bem estar em eqüinos**. Disponível em: <<http://www.cabanhaamarante.com.br>> Acesso em: 08 de Abril de 2011.

MAPA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/especies/equideos> Acesso em 14 de Abril de 2011

MCDOWELL, K. J; LITTLE, T. V.; TIMONEY, P. J E ADAMS, M. H. Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldins and geldins supplemented with testosterone. **Veterinary Science**. V. 61-1, p33-37. 1996.

METZ, K. W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**. v34, n4, p691-700. 1990

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

MORAES, A.M.; TORRES, C.A.A.; ROMUALDO, P.L.; CARVALHO, G.R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. in **46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Maringá, PR. 2009

MORAIS, R.N. Contribuicao ao estudo da biologia reprodutiva de jumentos. **MS Thesis** Sao Paulo - SP, USP. 1990.

MORRELL, J.M., JOHANNISSON, A., DALIN, A.M., HAMMAR, L., SANDEBERT, T., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Vet. Scand.** v50, p220-228.

MORTE, I. M.; RODRIGUES, A. M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A. S.; GAMBOA, S.; RAMALHO-SANTOS, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science.** v106, p 36-47. 2008

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 245-262. 2000.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, n.4, p.721–727. 1999.

NEUHOFF, V. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis** v9, p255–262. 1988.

NISHIKAWA Y. Studies on reproduction in horses. Tokyo, **Shiba Temuracho Minotoku**, 1959.

NOVAK, S.; RUIZ-SÁNCHEZ, A.; DIXTON, W.T; FOXCROFT, R. G E DYCK, M. K. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. **Journal of Andrology**. 2009.

OLIVEIRA, L.A; CAMPEL, J.E.G.; AZEVEDO, D.M.M.R.; COSTA, A.P.R.; TURCO, S.H.N.; MOURA, J.W.S. Estudo de respostas fisiológicas de eqüinos sem raça definida e da raça quarto de milha às condições climáticas de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**. v9, p827-838. 2008

PACHECO, J. C. G. **Efeito da sazonalidade sobre os níveis séricos da testosterona e o perfil protéico do plasma seminal eqüino**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

PANGAWKAR, G.R.; SHARMA, R. D.; SINGH, R. Protein, sialic acid and zinc concentration in the seminal plasma of bulls in relation to freezability of semen. **Indian Veterinary Journal** v65, p58-60. 1988

PARKS, J.E., LYNCH, D.V., 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology** v29, p255–266.

PICKETT, B.W., AMANN, R.P., MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L. Frequency of ejaculation. In: *Management of the Stallion for Maximum Reproductive Efficiency*. **Animal Reproduction Laboratory**, Colorado State University Bulletin, II, p73-81. 1989

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; SEIDEL Jr, G. E.; BERNDTSON, W. E.; VOSS, J. L. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 627-625. 1976.

PICKETT, B.W., FAULKNER, L.C., SUTHERLAND, T.M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**. v31 p713-728. 1970

PICKETT, B. W. Reproductive evaluation of the stallion. In: *McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds). Equine reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993b. p. 755-768.

PICKETT, B.W.; VOSS, L.J. Abnormalities of mating behavior in domestic stallions. In Rowlands, I.W.; Allen, W.R.; Rossdale, P.D.; eds. **Equine Reproduction**. Oxford: Blackwell, 1975

PICKETT, B.W., VOSS, J.L. Reproductive management of the stallion. **Proc Am Assoc Equine Prac** v18, p501-531. 1972

PICKETT, B.W., VOSS, J.L., SQUIRES, E.L. Factors affecting quality and quantity of stallion spermatozoa. **Comp Cont Educ Pratt Vet.** v5, p259-269. 1983

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

RETAMAL, C.; URZÚA, J.; ALVES, E.W.; LÓPEZ, M.L. Cytochemical and electrophoretic study of the stallion epididimal glycoproteins. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 32, p.117-130, 2000.

RONCOLETTA, M. Perfil em SDS-Page das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **ARS Veterinária.** v13, n2, p135-140. 1997

ROSER, J.F, MCCUE, P.M., HOYE, E. Inhibin activity in the mare and stallion. **Domestic Animal Endocrinology** v11, p87-100, 1994.

ROSER JF, HUGHES JP. Prolonged pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) to fertile stallions. **Journal of Reproduction Fertility** Suppl v44, p155-168, 1991.

ROSER, J.F., HUGHES, J.P. Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH induced LH response in fertile and subfertile stallions. **Journal of Andrology.** v13, p214-223, 1992.

SAMPER, J.C., HELLANDER, J.C., CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction Fertility** Suppl. v44, p107–114. 1991

SCHAMBONY, A., HESS, O., GENTZEL, M., TOPFER-PETERSEN, E., Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction Fertility** Suppl. 53, 67–72. 1998a.

SCHEMBRI, M.A., MAJOR, D.A., SUTTIE, J.J., MAXWELL, W.M., EVANS, G. Modification of standard freezing media to limit capacitation and maximize motility of frozen-thawed equine spermatozoa. **Aust. Vet. J.** v81, p748–751. 2003

STEWART, B.L. e ROSER, J.F Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations' in stallions. **Domestic animal endocrinology.** v 15(2), p129-139. 1998

TEIXEIRA, P.P.; MEIRINHOS, M.L.G.; PÁDUA, J.T.; VIEIRA, D. Variações cíclicas do cortisol, triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) no parto de éguas da raça quarto de milha. **Ciência Animal Brasileira.** v.9, n. 2, p. 263-271. 2008

THOM, E. C. Cooling degrees: day air conditioning, heating, and ventilating. **Transaction of the American Society of Heating, Refrigerating and Air Conditioning Engineers**, Atlanta, v. 55, n. 7, p. 65-72, 1977.

TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction Fertility.** (Suppl. 27), p53–59. 1979.

TREIN, C.R; ZIRKLER, H.; BUSTAMANTE-FILHO, L.C; MALSCHITZKY, E.; JOBIM, M.I.M, SIEME, H.; MATTOS, R.C. Equine seminal plasma proteins related with semen freezability. **Animal Reproduction Science.** v.107, p 352-353. 2008

VIDAMENT, M., DUPERE, A.M., JULIENNE, P., EVAIN, A., NOUE, P., PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology.** v48, p907–917. 1997.

ZAHN, F. S. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e protéicos do plasma seminal e do soro sanguíneo e das proteínas de membrana espermática e sua correlação**

com a qualidade do sêmen congelado em garanhões. 2006. 122 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova.** v21, n6, p787-793

WRENCH, N.; PINTO, C.R.F.; KLINEFELTER, G.R.; DIX, D.J.; FLOWERS, W.L.; FARIN, C.E. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. **Animal Reproduction Science.** v119, p219-227. 2010

ANEXOS

Anexo I

Composição da solução de formol salino tamponado formulado por Hancock, (1957)

Solução estoque de NaCl:

NaCl	9,01g
Água destilada	500mL

Solução estoque tampão:

Solução 1	
Na ₂ HPO ₄	21,68g
Água destilada q.s.p.	500mL
Solução 2	
KH ₂ PO ₄	11,13g
Água destilada q.s.p.	500mL
Solução Final	
Solução 1	200mL
Solução 2	80mL

Solução de formol-salina:

Solução estoque de NaCl	50mL
Solução estoque tampão	100mL
Formaldeído 40%	62,5mL
Água destilada	500mL

Anexo II

Descrição das soluções estoque e de trabalho empregadas na técnica da fluorescência para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozóides

Soluções	Constituintes	Quantidades
I. Solução estoque de FDA [*]	FDA	9,2 mg
	DMSO ^{***}	20 ml
II. Solução estoque de IP ^{**}	IP	10 mg
	Solução Fisiológica	20 ml
III. Solução estoque de formaldeído	Formalina a 40%	Diluição 1 : 80
	Solução Fisiológica	
IV. Solução estoque de citrato de sódio a 3%	Citrato de sódio	3 g
	Solução Fisiológica	100 ml
Solução de trabalho	Solução I	20 µl
	Solução II	10 µl
	Solução III	10 µl
	Solução IV	960 µl
Amostras para avaliação	Sêmen	10 µl
	Solução de Trabalho	40 µl

^{*}FDA = diacetato de 6-carboxifluoresceína ^{**}IP = iodeto de propídio ^{***}DMSO = dimetilsulfóxido

Anexo III

Solução trabalho para o reagente do teste do ácido bicinconínico (Lowry modificado)

	volume	composição
Reagente A	49 mL	Carbonato de sódio, Bicarbonato de sódio, ácido bicincônínico e tartrato de sódio em 0.1M de Hidróxido de Sódio.
Reagente B	1 mL	Sulfato de Cobre 4%.

Anexo IV

Solução de Reidratação:

	Conc. final	Quantidade
Uréia (PM = 60,06)	7 M	10,5 g
Tiouréia (PM = 76,12)	2 M	3,8 g
CHAPS	2 %	0,5 g
IPG buffer	0,5 ou 2% (v/v)	125 ou 500 µL
Azul de bromofenol 1 % (p/v)	0,002 %	400 µL
H ₂ O milli-Q	-----	~ 200 mL

Anexo V

Solução de Equilíbrio

	Conc. final	Quantidade
Uréia (PM = 60,06)	6 M	72,1 g
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	75 mM	10,0 mL
Glicerol (87 %) v/v	29,3 %	69 mL
SDS	2 %	4,0 g
Azulbde bromofenol 1 % (p/v)	0,002 %	400 µL
H ₂ O milli-Q	-----	Para 200 mL

Anexo VI

Gel de poliacrilamida a 12,5% para eletroforese bidimensional

Gel 2D (1,0 mm)	12,5 %
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	41,67 ml
Tampão Tris-HCl pH 8,8	25 ml
SDS 10 %	1,0 ml
H ₂ O deionizada	31,81 ml
* Persulfato de Amônia 10 %	500 µL
* TEMED	31,36 µL

* Adicionar por último, pois são os catalisadores da reação.