

COMPONENTES DO PLASMA SEMINAL E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO E FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES EQUINOS

Priscilla Nascimento Guasti¹
Gabriel Augusto Monteiro¹
Frederico Ozanam Papa²

RESUMO

Após sua formação no ambiente testicular, o espermatozóide necessita passar por um processo de maturação para que ele seja capaz de fertilizar o oócito. Durante o trânsito epididimário e a ejaculação, as células espermáticas entram em contato com os produtos secretórios das glândulas anexas e passam a adquirir motilidade progressiva, habilidade de reconhecimento e ligação com a zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito. Sabe-se que algumas proteínas aderidas à membrana espermática são semelhantes àquelas existentes no plasma seminal, sugerindo que estas são provenientes da interação dos produtos secretórios das glândulas anexas com as células espermáticas. Deste modo, a determinação dos componentes do plasma seminal poderia ser considerada uma forma de avaliação do ejaculado. Estudos indicam que o plasma seminal exerce várias funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação como a ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, proteção contra a acrosina por meio de inibidores de proteases, entre outros. Além disso, é mediador da capacitação espermática e da resposta inflamatória pós-coital no útero de éguas. Portanto, o estudo do perfil bioquímico e proteico do plasma seminal permite o isolamento e caracterização de substâncias correlacionadas positivamente com a criopreservação e a fertilidade do sêmen de garanhões, possibilitando o aprimoramento das técnicas de armazenamento de espermatozoides equinos e a identificação precoce de animais férteis em relação àqueles subférteis.

Palavras-chave: plasma seminal, espermatozóide, criopreservação, fertilidade, equino.

SEMINAL PLASMA COMPONENTS AND ITS INFLUENCE ON CRYOPRESERVATION AND FERTILITY OF EQUINE SPERMATOOZOA

ABSTRACT

After its formation in the testicular environment, sperm needs to go through a maturation process for enabling it to fertilize the oocyte. During epididymal transit and ejaculation, sperm cells come into contact with secretory products of the accessory glands and acquire progressive motility, ability to recognize and bind zona pellucida, and fusion with the plasma membrane of the oocyte. It is known that some proteins attached to the sperm membrane are similar to those present in seminal plasma, suggesting that these are from the interaction of secretory products of the accessory glands with spermatozoa. Thus, the determination of seminal plasma components could be considered a form of ejaculate evaluation. Studies indicate that seminal plasma plays several roles on metabolism and sperm fertilization process such as activation of sperm motility, antimicrobial activity, neutralization of sperm metabolites, protection against acrosin by protease inhibitors, among others. Furthermore, it

¹ Pós graduanda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil, priguasti@gmail.com

² Professor Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil, papa@fmvz.unesp.br

mediates sperm capacitation and post-coital inflammatory response in the uterus of mares. Therefore, the study of biochemical and protein profile of seminal plasma allows the isolation and characterization of components positively related to cryopreservation and fertility of stallion semen, enabling improvements in the storage techniques and early identification of fertile and subfertile animals.

Keywords: seminal plasma, sperm, cryopreservation, fertility, equine.

COMPONENTES DEL PLASMA SEMINAL Y SU INFLUENCIA SOBRE LAS CRIOPRESERVACIÓN Y FERTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS

RESUMEN

Después de su formación en el ambiente testicular, el espermatozoide necesita pasar por un proceso de maduración antes de ser capaz de fertilizar al ovocito. Durante el trayecto epididimario y la eyaculación, las células espermáticas entran en contacto con los productos de secreción de las glándulas anexas y comienzan a adquirir motilidad progresiva, capacidad de reconocimiento y unión con la zona pelúcida así como de fusión con la membrana plasmática del ovocito. Se sabe que algunas proteínas unidas a la membrana espermática son similares a aquellas existentes en el plasma seminal, lo que sugiere que estas son procedentes de la interacción de los productos secretorios de las glándulas anexas con las células espermáticas. De este modo, la determinación de los componentes del plasma seminal podría ser considerada una forma de evaluación del semen. Los estudios indican que el plasma seminal desempeña varias funciones en el metabolismo espermático y el proceso de fertilización, entre las que se incluyen: activación de la motilidad, actividad antimicrobiana, neutralización de los metabolitos de los espermatozoides y protección contra acrosina por inhibidores de la proteasa. Además, interviene en la capacitación espermática y respuesta inflamatoria post-coital en el útero de las yeguas. Por lo tanto, el estudio del perfil bioquímico y de las proteínas del plasma seminal permite el aislamiento y caracterización de sustancias correlacionadas positivamente con la criopreservación y la fertilidad del semen de caballo, lo que permite mejorar las técnicas de almacenamiento y la identificación precoz de animales fértiles en relación con los sub-fértiles.

Palabras claves: plasma seminal, espermatozoides, criopreservación, fertilidad, equino

INTRODUÇÃO

A espécie equina possui baixos índices de fertilidade quando comparada com as demais espécies domésticas. Parte dessas observações relaciona-se ao fato de que a equinocultura não seleciona os animais pela fertilidade. Além disso, há tendências de se atribuir à fêmea os problemas de infertilidade, comprometendo uma avaliação mais criteriosa envolvendo o macho (1).

Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito considerável. Neste contexto, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de correlacionar resultados de investigações laboratoriais com aqueles dos testes de fertilidade.

Sabe-se que o plasma seminal exerce várias funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação como: ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, proteção contra a acrosina por meio de inibidores de proteases, entre outros. Além disso, é mediador da capacitação espermática e da resposta inflamatória pós-coital no útero de éguas (2, 3).

Entretanto, as técnicas de criopreservação de sêmen equino preconizam a retirada do plasma seminal, uma vez que a presença do plasma seminal promove um efeito deletério sobre a preservação das células espermáticas (4).

Apesar de alguns estudos terem demonstrado que as proteínas aderidas à membrana espermática serem semelhantes às existentes no plasma seminal, a comprovação da fertilidade de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo tem questionado a necessidade dos componentes do plasma seminal no processo de fertilização, já que estes são capazes de fertilizar o oócito, sem nenhum contato prévio com as secreções das glândulas anexas (5-7).

O isolamento e caracterização dos componentes do plasma seminal possibilitam a avaliação de sua influência sobre as células espermáticas, o aprimoramento das técnicas de armazenamento e a identificação precoce de animais férteis em relação àqueles subférteis. O presente trabalho tem por objetivo revisar os componentes do plasma seminal e sua correlação com a criopreservação e a fertilidade de espermatozoides equinos.

REVISÃO DE LITERATURA

Maturação Espermática Pós-testicular

Os espermatozoides ao saírem do testículo ainda não são capazes de fertilizar o oócito. À medida que passam pelo epidídimo, os espermatozoides sofrem importantes alterações morfofuncionais, onde passam a ter capacidade fecundante (8).

O epidídimo é anatomicamente conectado ao testículo e pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. Cada região secreta substâncias específicas que promovem mudanças na composição química e protéica do fluido epididimário, essenciais para a manutenção da viabilidade da célula espermática (9).

As mudanças funcionais envolvem alterações do padrão de atividade flagelar e habilidade de se ligar à zona pelúcida. Mudanças na composição da membrana plasmática contribuem para estas mudanças funcionais. Elas são refletidas por mudanças na carga elétrica da superfície celular, ligação de lecitinas, distribuição de partículas intramembranas, fluidez da membrana, composição de lipídeos e proteínas e ligação de anticorpos (10).

Portanto, tanto os eventos da espermatogênese quanto a maturação pós-testicular são necessários para a competência das células espermáticas frente à fertilização (10).

Plasma Seminal

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozoides, que compõem menos que 1% do volume total e o plasma seminal (11). O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias, sendo expelido em frações durante a ejaculação por meio de contrações uretrais (4).

A primeira porção ejaculada é a fração pré-espermática, translúcida, e provém das glândulas bulbouretrais e da próstata. Esta fração possui a função de limpeza da uretra. A segunda fração possui aspecto leitoso, é rica em espermatozoides, glicerilfosforilcolina (GPC) e ergotineína, e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente. A terceira porção contém poucos espermatozoides, porém grandes quantidades de ácido cítrico e gel proveniente das glândulas vesiculares, com a função de carrear os poucos espermatozoides que restaram na uretra (12).

O volume do ejaculado do garanhão pode chegar a 200 mL, sendo 10 a 20 vezes maior do que o ejaculado de touros e 50 a 100 vezes maior do que o ejaculado de carneiros. Entretanto, o número total de espermatozoides por ejaculado é similar nas três espécies, demonstrando a grande contribuição do plasma seminal no sêmen de equinos (13).

Principais Componentes do Plasma Seminal

Alguns constituintes do plasma seminal equino já foram isolados e identificados, entretanto informações sobre sua origem, estrutura e funções continuam limitados (14). A variabilidade individual entre garanhões com relação à composição bioquímica e protéica do plasma seminal (15) dificulta a obtenção de resultados consistentes em relação a estes componentes.

Proteínas

A maioria das proteínas presentes no plasma seminal é proveniente do epidídimo e estão envolvidas na remodelação da membrana espermática, que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação (9).

A secreção de proteínas no epidídimo é altamente regionalizada, sendo a cabeça e o corpo as regiões mais ativas. Na espécie equina, cerca de 73% dos compostos protéicos são secretados na cabeça do epidídimo (9, 10).

As proteínas epididimárias adquiridas pela membrana espermática durante o trânsito epididimário são classificadas de acordo com o tipo de interação com a célula espermática. Podem ocorrer ligações fracas, responsáveis pela quiescência dos espermatozoides; ligações fortes, importantes no trato reprodutivo da fêmea e na fertilização; modificações das proteínas da membrana plasmática, encobrendo ou expondo receptores; ou presença de proteínas livres no fluido epididimário, colaborando com a manutenção do meio (16).

Em relação às proteínas provenientes do plasma seminal, oito proteínas de baixo peso molecular (14 a 30 kDa) foram isoladas e caracterizadas, e são denominadas proteínas do plasma seminal equino (HSP-1 a HSP-8). Todas as HSP agregam-se à superfície espermática durante a ejaculação, exceto a HSP-4 (17).

Até o momento, sabe-se que a maioria das proteínas seminais pertence a três grupos, são elas: proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs), e as espermadesinas (4).

As proteínas do grupo Fn-2 apresentam número variável de domínios de fibronectina do tipo II e estão presentes ao longo de todo o trato reprodutivo masculino, sendo expressas no corpo e cauda do epidídimo e na ampola do ducto deferente (18). Essas proteínas interagem especificamente com colina-fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide no momento da ejaculação e possuem habilidade de se ligar à heparina. A heparina é estruturalmente semelhante aos glicosaminoglicanos (GAGs), estes são secretados em grandes quantidades no oviduto e nos fluidos uterinos durante a fase folicular da égua, e parece mediar o processo de capacitação espermática por meio do efluxo de colesterol e fosfolipídeos (19).

As proteínas HSP-1 e HSP-2 representam 70-80% das proteínas totais do plasma seminal equino e pertencem ao grupo das proteínas Fn-2, sendo caracterizadas pela habilidade de ligação à heparina (18).

O segundo grupo de proteínas importantes em equinos é representado pelas CRISP, estas são caracterizadas por apresentarem 16 resíduos de cisteína em sua estrutura molecular e são divididas em CRISP1, CRISP2 e CRISP3. A CRISP 1 é expressa ao longo do epidídimo, enquanto a CRISP 2 é expressa no testículo, epidídimo e glândulas vesiculares. Segundo Töpfer-Petersen et al. (17), foi observada a completa perda de expressão de CRISP 2 no testículo e no epidídimo de um garanhão criptorquídico.

Em maior quantidade, proteínas da classe CRISP 3 são expressas desde o epidídimo até o resto do trato genital, com alta expressão na ampola do ducto deferente. As CRISPs são expressas sob controle androgênico e ligam-se na região equatorial, pós-acrossomal e na peça intermediária dos espermatozoides, estando intimamente relacionadas com a fusão do espermatozoide ao ócito. A proteína HSP-3 pertence ao grupo CRISP, sendo estruturalmente semelhante às proteínas deste grupo (20).

As espermedesinas possuem de 110 a 113 aminoácidos na sua estrutura e compreendem um único domínio CUB (domínio protéico) estabilizado por pontes dissulfídicas. Estas proteínas são multifuncionais e exibem habilidade para se ligar à heparina, a inibidores de proteinase, fosfolipídeos e a carboidratos (17). A HSP-7 é a maior representante das espermatodesinas em ganhões, e é secretada durante o trajeto do espermatozóide pelo ducto epididimário. Esta se liga à zona pelúcida intacta, mostrando seu papel na interação espermatozóide-zona pelúcida (21).

Além disso, o plasma seminal possui evidente efeito imunossupressor sobre a endometrite pós-cobertura, por meio da supressão da ativação do complemento e da quimiotaxia das células polimorfonucleares. Estudos indicam que esta atividade imunossupressora está relacionada com a presença de determinadas proteínas no plasma seminal, ao impedir a ligação do espermatozóide às células polimorfonucleares (3, 22).

Enzimas

A grande maioria das enzimas encontradas no plasma seminal funciona como agente antioxidante, prevenindo a peroxidação dos lipídeos de membrana pelas espécies reativas ao oxigênio e, conseqüentemente, fragmentação do DNA espermático (23).

A catalase, superóxido dismutase (SOD) e o sistema glutatona peroxidase/reductase (GPx/GRD) são as principais enzimas com ação antioxidante encontradas no sêmen (24). O plasma seminal equino possui uma alta atividade da enzima catalase, e esta provém principalmente das secreções prostáticas (25).

A enzima aspartame-amino-transferase (AST) presente no plasma seminal equino parece estar correlacionada com a motilidade dos espermatozoides. Defeitos na membrana plasmática do espermatozóide na região da peça intermediária, onde localiza-se a AST, levam à perda desta enzima, causando o bloqueio da produção de adenosina trifosfato (ATP), responsável pela cinética espermática (26).

A enzima fosfatase alcalina (FA) é expressa em grandes quantidades nos testículos e epidídimos. A quantificação desta enzima pode ser utilizada como marcador para diferenciar azoospermia verdadeira (altos níveis de FA) de falhas na ejaculação (baixos níveis de FA) e azoospermia por bloqueio da ampola do ducto deferente (27).

Hormônios

As secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino são essenciais para o desenvolvimento e a maturação dos espermatozoides. Em equinos, a presença de prostaglandinas (PGF_{2α} e PGE₂), estrógeno e ocitocina está associada ao transporte espermático e à eliminação de espermatozoides não viáveis, auxiliando na limpeza uterina de éguas susceptíveis à endometrite (3).

Particularmente em ganhões, grandes quantidades de estrógeno são produzidas pelos testículos, principalmente pelas células germinativas (28). O papel fisiológico do alto nível de estrógeno no plasma seminal de ganhões ainda não está elucidado. Entretanto, em suínos, o estrógeno em tais níveis promove o aumento da contratilidade uterina, facilitando o transporte espermático (29).

Estudos em roedores e suínos indicam que a prostaglandina E₂ (PGE₂) promove um efeito local na camada muscular longitudinal do oviduto levando ao aumento do diâmetro luminal (30). Um mecanismo regulatório similar ocorre em éguas, a PGE₂ é responsável pelo transporte do embrião e parece facilitar a passagem dos espermatozoides ao longo do oviduto (3).

A presença de prostaglandina F_{2α} e ocitocina no plasma seminal está relacionada à contração do miométrio. As contrações uterinas agem fisicamente para a remoção de líquido acumulado e produtos nocivos resultantes do processo de inflamação após a cobertura ou inseminação artificial (3).

Íons

A função espermática é altamente dependente do ambiente iônico. A composição iônica do plasma seminal varia entre as frações do ejaculado, e também entre animais da mesma espécie. As concentrações de cálcio, fosfato inorgânico e magnésio são maiores na fração espermática, composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente (4).

O íon cálcio é um importante regulador da fisiologia espermática, apresenta-se em grandes concentrações nos produtos secretórios da próstata, da glândula vesicular e do epidídimo. Este íon é apontado como desencadeador da reação acrossômica em espermatozoides de mamíferos, e diversas evidências mostram seu envolvimento na motilidade (31).

O magnésio desempenha um papel fundamental como co-fator em mais de 300 reações enzimáticas que envolvem o metabolismo energético e a síntese de ácidos nucleicos. Sabe-se ainda que o magnésio é considerado um marcador da secreção das vesículas seminais e que age como antagonista intracelular do cálcio (31).

O zinco é originado principalmente da próstata, e desempenha um papel importante na motilidade espermática, exercendo atividade protetora antioxidante. É considerado também como fator antimicrobiano para bactérias gram-negativas e positivas (32).

O cobre é essencial para a funcionalidade de algumas enzimas. A enzima Cu-Zn-superóxido dismutase (SOD), envolvida na proteção dos espermatozoides contra radicais livres, e a enzima citocromo oxidase, responsável pelo fornecimento de energia e pela imunidade celular e humoral, são dependentes do íon cobre. Estudos indicam que elevados níveis de cobre reduzem o processo oxidativo e a glicólise, o que pode levar à imobilidade e redução de viabilidade dos espermatozoides (33).

Influência do Plasma Seminal na Criopreservação de Espermatozoides Equinos

As técnicas de congelamento de sêmen equino preconizam a retirada do plasma seminal, uma vez que estudos demonstraram efeito deletério sobre a preservação das células espermáticas quando este não é removido do sêmen (4).

Rigby et al. (34) demonstraram que o efeito do plasma seminal sobre a motilidade espermática para alguns ganhos pode ser prejudicial e se torna mais evidente em condições de refrigeração. Animais que apresentavam redução acentuada da motilidade espermática após o processo de refrigeração convencional (5°C/24-48h), demonstraram um aumento na cinética espermática quando há a remoção parcial do plasma seminal antes da refrigeração.

Alghamdi et al. (35) demonstraram que a adição de plasma seminal em concentração reduzida (<5%) melhora a qualidade do sêmen descongelado, ocorrendo o oposto quando houve a remoção total ou adição de altas concentrações (10-30%) de plasma seminal. No entanto, Moore et al. (36) verificaram que a criopreservação de espermatozoides com mais de 80% de plasma seminal não alterou a motilidade espermática.

Diversos trabalhos demonstram que a criopreservação do sêmen aumenta a produção de ROS (espécies reativas ao oxigênio). As ROS induzem dano ao DNA espermático e causam rápida perda do potencial fertilizante dos espermatozoides por meio da peroxidação lipídica da membrana plasmática (37).

Agentes antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina) são encontrados no plasma seminal, a fim de proteger os espermatozoides do dano celular causado pelo estresse oxidativo (38).

Kankofer et al. (39) investigaram a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, em sêmen equino resfriado. Observaram que a preservação do sêmen por 24 horas a 5°C não alterou a atividade enzimática, bem como não aumentou a

lipoperoxidação, sugerindo que a atividade das enzimas inibe a peroxidação dos lipídios da membrana pelas ROS.

Almeida (24) avaliou diferentes concentrações de plasma seminal (0%, 5%, 25% e 50%) na proteção contra o estresse oxidativo e danos aos espermatozóides eqüinos criopreservados, e concluiu que a adição de plasma seminal protege contra a peroxidação lipídica durante a criopreservação. Entretanto, quando utilizado em concentrações acima de 25%, leva a uma redução na viabilidade dos espermatozóides, indicando que baixas concentrações de plasma seminal são essenciais para a manutenção da qualidade espermática.

A criopreservação de espermatozóides eqüinos também está associada ao aumento da fragmentação do DNA, sendo prejudicial à manutenção da integridade do material genético. Um dos motivos pode estar relacionado com a retirada do plasma seminal, que confere proteção aos espermatozóides contra o estresse oxidativo (24, 40). No entanto, Love et al. (41) constataram que a remoção prévia de plasma seminal do sêmen eqüino refrigerado por 24-48 horas conferiu proteção à integridade do DNA espermático. Além disso, danos ao DNA aumentaram à medida que foi adicionado plasma seminal às amostras, sugerindo que substâncias que compõem o plasma seminal são prejudiciais à integridade do DNA espermático.

Estudos relataram que a adição de plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade ao sêmen de animais de baixa congelabilidade melhorou a resistência ao processo de congelamento e descongelamento, ocorrendo o oposto quando se adicionou plasma seminal proveniente de garanhões de baixa congelabilidade. Este trabalho demonstrou que a variabilidade individual na composição do plasma seminal é um dos fatores que determinam a congelabilidade do sêmen de garanhões (42).

Apesar da evidente influência do plasma seminal sobre a viabilidade espermática, estudos demonstraram que espermatozóides epididimários são mais resistentes ao processo de criopreservação do que espermatozóides ejaculados (43, 44). Acredita-se que as mudanças no conteúdo e composição dos lipídeos da membrana plasmática que ocorrem no contato dos espermatozóides com o plasma seminal durante a ejaculação conferem maior fluidez à membrana plasmática e, conseqüentemente, menor resistência ao choque térmico (43).

A grande variabilidade dos resultados obtidos com plasma seminal deve-se principalmente à utilização de diferentes métodos de pesquisa. Fatores como diluição, temperatura, tempo, método de centrifugação e variação individual entre garanhões afetam a viabilidade espermática durante o armazenamento (4).

Influência do Plasma Seminal na Fertilidade de Espermatozóides Equinos

O sucesso da reprodução depende de uma cascata de eventos, primeiramente da espermatogênese, que corresponde ao processo de divisão e diferenciação das células espermáticas ainda no testículo. Em seguida, durante o trânsito epididimário e a ejaculação, os espermatozóides entram em contato com diferentes secreções provenientes das glândulas acessórias que promovem importantes mudanças na composição da membrana espermática e nas proteínas de superfície. Na seqüência, os espermatozóides são capacitados durante a passagem pelo trato genital feminino, e sofrem a reação acrossomal, até que um deles seja capaz de penetrar a zona pelúcida e, finalmente, fundir-se com o oócito (45).

Relatos na literatura sobre o perfil eletroforético de proteínas do plasma seminal de equinos indicam que certas proteínas demonstram relação com a fertilidade de espermatozóides equinos. Da mesma forma, estas possuem propriedades biológicas semelhantes à de proteínas do plasma seminal de outros mamíferos que estimulam ou inibem a fertilidade, podendo ser utilizadas como marcadores de fertilidade (4, 46, 47).

Recentemente, Heise et al. (48) verificaram a influência do plasma seminal na fertilidade de espermatozóides epididimários equinos. Constatou-se que a exposição destes

espermatozoides ao plasma seminal aumenta a taxa de concepção quando utilizado a fresco ou congelado. Contudo, Morris et al. (49) não obtiveram resultados similares, onde a adição de plasma seminal aos espermatozoides criopreservados da cauda do epidídimo de garanhões não demonstrou influência sobre os índices de concepção, independente do método de inseminação (histeroscopia ou pipeta flexível).

No entanto, a função das secreções das glândulas anexas durante o processo de fertilização ainda é duvidosa. Muitos estudos têm questionado sua necessidade no processo de fertilização, visto que os espermatozoides do epidídimo são capazes de fertilizar o ócito, ou seja, sem nenhum contato com o produto de secreção destas glândulas (5-7).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito do plasma seminal sobre a congelabilidade e a fertilidade de espermatozoides equinos permanece controverso, já que relatos de literatura são conflitantes. Do mesmo modo, comparações diretas entre os vários estudos tornam-se difíceis, devido à grande variabilidade individual com relação à composição do plasma seminal e a utilização de diferentes métodos de pesquisa, como taxa de diluição, temperatura, tempo ou método de centrifugação.

O estudo do perfil bioquímico e proteico do plasma seminal permite o isolamento e caracterização de substâncias correlacionadas positivamente com a criopreservação e a fertilidade do sêmen de garanhões, possibilitando o aprimoramento das técnicas de armazenamento de espermatozoides equinos e a identificação segura e precoce de animais férteis em relação àqueles subférteis.

Novas pesquisas devem ser realizadas no intuito de ampliar os conhecimentos sobre a influência dos componentes do plasma seminal na célula espermática e se este é essencial durante o processo de fertilização, visto que foi comprovado que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo são capazes de fertilizar o ócito, ou seja, sem nenhum contato com o produto de secreção das glândulas anexas.

REFERÊNCIAS

1. Pimentel CA. Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão. In: Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 1989, Belo Horizonte. Belo Horizonte: CBRA; 1989. v.8, p.127-32.
2. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod.* 2002;17:2904-11.
3. Troedsson MHT, Desvousges AS, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci.* 2005;89:171-86.
4. Kareskoski M, Katila T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci.* 2008;107:249-56.
5. Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'Aqua Junior JA, Zahn FS, Alvarenga MA. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci.* 2008;107:293-301.
6. Guasti PN. Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2010.

7. Monteiro GA. Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2010.
8. Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Iowa State University Press; 1989.
9. Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech.* 2003;61:7-17.
10. Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V, et al. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:321-39.
11. Wite RG. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: Hafez ESE. *Reprodução animal.* 4a ed. São Paulo: Manole; 1988. p.212-28.
12. Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. In: Mckinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction.* Philadelphia: Saunders; 1993. p.715-45.
13. Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology.* 1987;28:709-23.
14. McDowell KJ, Little TV, Timoney PJ, Adams MH. Characterization of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. *J Vet Sci.* 1996;61:33-7.
15. Zahn FS. 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 [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2006.
16. Marengo SR. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod Sci.* 2008;105:52-63.
17. Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci.* 2005;89:159-70.
18. Ekhlasi-Hundrieser M, Schafer B, Kirchhof C, Hess O, Bellair S, Müller P, et al. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev.* 2005;70:45-57.
19. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.* 2002;53:109-19.
20. Schambony A, Hess O, Gentzel M, Töpfer-Petersen E. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. *J Reprod Fertil.* 1998;53:67-72.

21. Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem.* 1996;242:636-40.
22. Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MHT. Equine seminal plasma binding to polymorphonuclear neutrophils (PMN) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction.* 2004;127:593-600.
23. Lewis SEM, Sterling ESL, Young IS. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 1997;67:142-7.
24. Almeida JL. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino [dissertação]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2006.
25. Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IK. Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res.* 2000;61:1026-69.
26. Colenbrander B, Fazelli AR, Van Buiten A, Parlevliet J, Gadella BM. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Vet Scand.* 1992;88:49-58.
27. Turner RMO, McDonnell SM. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology.* 2003;60:1-10.
28. Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:52.
29. Claus R, Ellendorf F, Hoang-Vu C. Spontaneous electromyographic activity throughout the cycle in the sow and its change by intrauterine oestrogen infusion during oestrus. *J Reprod Fertil.* 1989;87:543-51.
30. Rodriguez-Martinez H, Einarsson S. Influence of prostaglandins on the spontaneous motility of pig oviducts. *Anim Reprod Sci.* 1985;8:259-79.
31. Wong WY, Flik G, Groenen PMW, Swinkles DW, Thomas CMG, Copius-Peereboom JHJ, et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol.* 2001;15:131-6.
32. Barrier-Battut I, Delajarrad H, Legrand E, Bruyas JF, Fiéni F, Tainturier D, et al. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology.* 2002;58:229-32.
33. Leonard-Marek S. Influence of drugs, pollution and trace elements on male fertility. In: Busch W, Holzmann A. *Andrology in veterinary medicine.* Schattauer: Stuttgart; 2001. p.474-81.
34. Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Theriogenology.* 2001;68:171-80.

35. Alghamdi AS, Troedsson MH, Xue JL, Crabo BG. 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.* 2002;63:880-5.
36. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;63:2372-81.
37. Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res.* 2001;62:508-15.
38. Bustamante Filho IC. Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
39. Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 50C. *Theriogenology.* 2005;63:1354-65.
40. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl.* 2003; 24:621-8.
41. Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology.* 2005;63:1584-91.
42. Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology.* 1996; 46:791-7.
43. Johnson L, Amann RP, Pickett BW. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am J Vet Res.* 1980;41:1190-6.
44. Monteiro GA, Papa FO, Guasti PN, Freitas NPP, Melo CM, Avanzi BR, et al. Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. *Vet Zootec.* 2011;18:255-63.
45. Leeb T, Sieme H, Töpfer-Petersen E. Genetic markers for stallion fertility – lessons from humans and mice. *Anim Reprod Sci.* 2005;89:21-9.
46. Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayer-Hosken. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology.* 1999;52:863-73.
47. Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, et al. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology.* 2010;74:956-67.
48. Heise A, Kahn W, Volkmann DH, Thompson PN, Gerber D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2010;118:48-53..

49. Morris L, Tiplady C, Allen WR. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*. 2002;58:643-6.

Recebido em: 02/08/11

Aceito em: 26/04/12