A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen eqüino a + 4°C*

FREDERICO LANÇA SCHMITT

Rodrigo Costa Mattos (Orientador - UFRGS)
Maria Inês Mascarenhas Jobim (Co-orientadora - UFRGS)
Ender Rosana Oberst (Co-orientadora - UFRGS)

Banca: Carlos Antonio Mondino Silva (UFSM), Eduardo Médici (URCAMP), Ricardo Macedo Gregory (UFRGS)

O presente trabalho constou de três experimentos. O primeiro objetivou verificar a influência de diferentes concentrações de plasma seminal e de dois diluentes na motilidade e na integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides eqüinos resfriados. Para tanto, foram utilizados 4 garanhões, comprovadamente férteis e em atividade sexual. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado, diluído 1:2 com EDTA-glicose, dividido em oito alíquotas e centrifugado a 600g, por 10 minutos, para remoção do plasma seminal. O *pellet* de cada alíquota foi ressuspensionado com um determinado volume do plasma seminal, previamente removido e acrescido de um determinado volume de um dos dois diluentes (leite desnatado UHT ou leite desnatado-glicose) até atingir uma concentração final entre 40 e 50x10⁶ espermatozoides/ml, contendo as seguintes concentrações finais de plasma seminal: 0%, 2,5%, 5% e 10%. Imediatamente após a diluição, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva e total e funcionalidade e integridade da membrana plasmática. A seguir, os oito frascos contendo o sêmen, com um volume aproximado de 12 ml cada, foram resfriados em câmara a +4°C a uma taxa de resfriamento de 0,3°C/min, sendo o sêmen novamente avaliado às 24, 48 e 72 horas. O segundo experimento objetivou verificar o perfil protéico do plasma seminal de garanhões de alta fertilidade e de baixa fertilidade. Para tanto, foram utilizados 4 garanhões, sendo 2 com boa qualidade de sêmen e dois com baixa qualidade de sêmen. Após a coleta o sêmen foi centrifugado duas vezes a 3000g por 20 minutos para retirar o plasma seminal e este foi congelado a -196°C. No momento da realização da eletroforese bidimensional, o plasma foi descongelado à temperatura ambiente, novamente centrifugado a 10000g por 1 hora, e sua proteína mensurada. O terceiro experimento objetivou verificar a influência do plasma seminal de garanhões com baixa qualidade espermática na motilidade e integridade e funcionalidade de membrana plasmática de espermatozoides de garanhões com alta qualidade espermática e vice-versa. Para tanto, foram utilizados 4 garanhões, dois com alta qualidade (AQ) e dois com baixa qualidade de sêmen (BQ). Os garanhões tiveram seu sêmen previamente coletado para realizar um banco de plasma seminal. Para tanto, o sêmen foi centrifugado duas vezes a 3000g por 20 minutos, dividido em alíquotas de 1,5 ml, identificado e congelado a -196°C. Quando da utilização, o plasma seminal foi descongelado em banho-maria a +37°C. Foram realizadas 5 coletas de sêmen de cada garanhão. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado e diluído 1:2 com EDTA-glicose, dividido em cinco alíquotas e centrifugado a 600g, por 10 minutos, para remoção do plasma seminal. O *pellet* de cada alíquota recebeu com uma determinada quantidade de plasma seminal, do banco de plasma, e um determinado volume de Leite UHT, até atingir uma concentração final entre 40 a 50x10⁶ espermatozoides/ml. Nos garanhões de alta e de baixa qualidade de sêmen, foi acrescido ao *pellet*, após a centrifugação, plasma seminal de garanhões de baixa (BQ) e de alta (AQ) qualidade de sêmen, em concentrações finais de 0%, 2,5% e 5%. Imediatamente após a diluição, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva e total e funcionalidade e integridade de membrana plasmática. A seguir, os dez frascos contendo o sêmen, com um volume aproximado de 12 ml cada, foram resfriados em incubadora, a +4°C e reavaliado às 24h, 48h e 72h horas. Concluiu-se que concentrações de até 5% de plasma seminal não afetam a motilidade, a funcionalidade e a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides; concentrações de 2,5% de plasma seminal provenientes de garanhões de alta qualidade de sêmen melhoram a motilidade espermática de garanhões de baixa qualidade de sêmen; concentrações de 2,5% de plasma seminal melhoram os percentuais de funcionalidade e integridade de membrana. As bandas protéicas 5 e 19 do plasma seminal não foram identificadas nos garanhões de baixa qualidade de sêmen; as bandas protéicas 3 e 17 apresentaram densidade óptica superior nas amostras de garanhões de baixa qualidade de sêmen, enquanto que a banda protéica 31 foi superior nos animais de alta qualidade, constituindo-se em prováveis marcadores de qualidade do sêmen. A utilização de leite desnatado UHT proporcionou melhores resultados de motilidade e integridade de membrana, em comparação ao leite-glicose.

Descritores: sêmen eqüino, plasma seminal, sêmen resfriado, eletroforese, proteínas.

Apresentada: 27 novembro 2002

* Dissertação de Mestrado nº 339 (Especialidade: Biotécnicas da Reprodução). 84f. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária - UFRGS, Porto Alegre/RS. CORRESPONDÊNCIA: F. L. Schmitt [kikols@ig.com.br].

Seminal plasma concentration, composition and quality and the preservation of equine semen at +4°C**

FREDERICO LANÇA SCHMITT

Rodrigo Costa Mattos (Adviser - UFRGS)
Maria Inês Mascarenhas Jobim (Co-adviser - UFRGS)
Eneider Rosana Oberst (Co-adviser - UFRGS)

Committee: Carlos Antonio Mondino Silva (UFSM), Eduardo Médiçi (URCAMP), Ricardo Macedo Gregory (UFRGS)

The present study included three experiments. The first one aimed to detect the influence of different equine seminal plasma concentrations and of two different extenders on equine sperm motility and plasmatic membrane integrity and functionality. Four proven fertile, sexually active stallions were used. Sperm was evaluated immediately after collection, diluted 1:2 with EDTA-glucose, divided in eight samples and centrifuged at 600g for 10 minutes for supernatant removal. Each pellet received a certain volume of the previously removed seminal plasma, plus a certain volume of extender (UHT skim milk or skim milk-glucose) so that a final sperm count between 40 and 50x10⁶ sperm/ml was reached, with the following seminal plasma concentrations: 0%, 2.5%, 5% and 10%. Immediately after dilution, sperm was evaluated for progressive and total motility and membrane integrity and functionality. Afterwards, the eight flasks containing about 12 ml sperm each were cooled in a +4°C chamber at a cooling rate of 0.3°C/minute. Sperm was evaluated again after 24, 48 and 72h. The second experiment aimed to determine seminal plasma proteins in high and low fertility stallions. Four stallions were studied, two with high quality and two with low quality semen. After collection, semen was centrifuged twice at 3000g for 20 minutes for seminal plasma removal, which was frozen at -196°C. At the moment of performing bi-dimensional electrophoresis, seminal plasma was thawed at room temperature, centrifuged at 10000g for 60 minutes and protein content was evaluated. The third experiment aimed to determine the influence of seminal plasma from low quality semen stallions on sperm motility and membrane integrity and functionality from high quality semen stallions, and vice-versa. Four stallions were used, two of high quality (HG) and two of low quality (LQ) semen. Their seminal plasma was collected previously in order to make a sperm bank. For that, semen was centrifuged twice at 3000g for 20 minutes, divided in 1.5 ml samples, identified and frozen at -196°C. For use, seminal plasma was thawed in water bath at 37°C. Five ejaculates from each stallion were used. Immediately after collection semen was evaluated and diluted 1:2 with EDTA-glucose, divided in five samples and centrifuged at 600g for 10 minutes for plasma removal. Each pellet received a certain seminal plasma volume (from the seminal plasma bank), plus a certain volume of UHT milk, so that a final sperm count between 40 and 50x10⁶ sperm/ml was reached. Pellets of stallions with high and low quality semen received seminal plasma from stallions with high (HQ) and low quality (LQ) semen at final concentrations of 0%, 2.5% and 5%. Immediately after dilution, semen was evaluated for sperm progressive and total motility and membrane integrity and functionality. Afterwards, the ten flasks containing about 12 ml semen were cooled in a 4°C chamber and evaluated again after 24, 48 and 72h. It was concluded that concentrations of until 5% seminal plasma do not affect sperm motility or membrane integrity and functionality; concentrations of 2.5% seminal plasma from high quality semen stallions improve sperm motility in low quality semen stallions; concentrations of 2.5% seminal plasma improve sperm membrane integrity and functionality rates. Seminal plasma protein bands 5 and 19 were not found in low quality semen stallions; protein bands 3 and 17 showed superior optical density in the samples from low quality semen stallions, while protein band 31 was superior in high quality semen animals, becoming probable semen quality markers. The use of UHT skim milk offered better results concerning sperm motility and membrane integrity, in comparison to milk-glucose.

Key words: equine semen, seminal plasma, cooled semen, electrophoresis, proteins.

Presented: 27 november 2002

** Master's Thesis no. 339 (Field: Biotechnics of Reproduction). 84p. Postgraduate Program in Veterinary Sciences, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/Brazil. CORRESPONDENCE: F. L. Schmitt [kikols@ig.com.br].