



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Maneio reprodutivo em equinos: Expressão da Decorina e da CD147 no endométrio da égua; Avaliação da qualidade do sémen de cavalo de raça Garrana, após criopreservação.

Ália Diana Henriques Barbosa Santa

Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do Grau de

Mestre em Agro-Pecuária

Orientador: Maria Rosa Rebordão Cordeiro Simões Crisóstomo

Coimbra, 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Maneio reprodutivo em equinos: expressão da Decorina e da CD147 no endométrio da égua; avaliação da qualidade do sémen de cavalo de raça Garrana, após criopreservação.

Ália Diana Henriques Barbosa Santa

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em 2019

Orientador: Maria Rosa Rebordão Cordeiro Simões Crisóstomo

Coimbra, 2019

Agradecimentos

A realização deste relatório de estágio de mestrado contou com importantes apoios e sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais estarem sempre grata.

À Professora Doutora Maria Rosa Rebordão, pela sua orientação, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, pela disponibilidade, pela colaboração total neste estágio e pelas palavras de incentivo.

Ao Professor Doutor Pedro Pinto Bravo, pelo apoio, pelos desafios e pelo conhecimento que transmitiu.

À Dona Conceição pelo profissionalismo, por nunca deixar faltar material durante os estudos, pelo carinho e apoio.

Aos meus pais por serem modelos de coragem e determinação, pelo carinho incondicional e por todo o incentivo que me deram durante a minha vida toda.

Ao meu namorado que esteve sempre ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, pela força e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos que me deram incentivo e apoio nesta fase.

Resumo

Aspectos reprodutivos ligados a ambos os sexos condicionam a implementação de um programa reprodutivo eficiente. Neste trabalho foram abordados dois tópicos relacionados com reprodução em equinos. No primeiro estudo, objectivou-se avaliar a expressão de proteínas da matriz extra-celular, a Decorina e o Cluster de Diferenciação 147 (CD147), em cortes histológicos de endométrio equino saudável e com diferentes graus de fibrose periglandular, através de imunohistoquímica e de western blot. Não obtivemos marcação com o CD147. Em relação à Decorina, as marcações que nos pareciam indicar a sua presença no endométrio, demonstraram-se inespecíficas. São necessários mais estudos, com outros anticorpos, de forma a caracterizar a expressão destas proteínas no endométrio da égua. No entanto, os nossos resultados sugerem a existência de uma relação do colagénio 1 e do α -SMA à medida que aumenta a categoria de endométrio da égua.

No segundo estudo avaliou-se o efeito de diferentes procedimentos de congelação, na qualidade do sémen de cavalo de raça Garrana. Quatro ejaculados de um garanhão foram submetidos a dois diluidores de congelação (Gent® e BotuCrio®) e dois tempos de centrifugação (10 e 20 minutos). Foi ainda estudado o efeito de um meio de centrifugação do sémen (Centrifugation Cushion for Semen®). Cada ejaculado foi assim submetido a 8 tratamentos. Foi avaliada a mobilidade, concentração, vitalidade e morfologia dos espermatozoides, no sémen antes da congelação, no congelado e no sobrenadante. Segundo os resultados obtidos, a centrifugação durante 10 minutos e o uso de cushion parece ser a melhor forma de processar o sémen para congelação, ao originar melhores taxas de vitalidade e mobilidade.

Palavras-chave: CD147, Criopreservação, Decorina, Endometrose, Garrano, Sémen.

Abstract

Reproductive aspects linked to both sexes influence an efficient reproductive program. In this work two topics related to reproduction in horses were addressed. The first study aimed to evaluate the expression of extracellular matrix proteins, Decorine and Cluster of Differentiation 147 (CD147), in histological sections of healthy equine endometrium and with different degrees of periglandular fibrosis. Immunohistochemistry and western blot were used. No immunolabeling for CD 147 was detected in mare endometrium. In immunohistochemistry studies, decorine immunolabels, which seemed to us to demonstrate its presence in the mare's endometrium were nonspecific. Further studies with other antibodies should be performed to characterize the expression of these proteins in the mare's endometrium. However, our results suggest a relationship between collagen 1 and α -SMA, as the Kenney endometrial category of the mare increases.

The second study aimed to evaluate the effect of different freezing procedures on the quality of Garrana horse semen. Four ejaculates from one stallion were subjected to two commercial freezing extenders (Gent® and BotuCrio®) and two centrifugation times (10 and 20 minutes). The effect of a cushion media (Centrifugation Cushion for Semen®) was also studied. Thus, each semen sample was subjected to 8 different treatments. Mobility, concentration, viability and morphology of sperm were evaluated in semen before freezing, frozen semen and in supernatant. According to our results semen centrifugation for 10 minutes and the use of cushion seems to be the better way to process semen for cryopreservation, since it was the procedure with better viability and mobility rates.

Keywords: CD147, Cryopreservation, Decorin, Endometrosis, Garrano Breed, Semen.

Índice

I. Introdução geral e objetivos.....	13
II. Trabalho experimental 1 – Expressão da Decorina e da CD 147 no endométrio da égua .	15
1. Objetivos	15
2. Revisão Bibliográfica.....	15
2.1. Anatomo-fisiologia do aparelho reprodutor da égua.....	15
2.2. O endométrio equino.....	16
2.3. A endometrose na égua	17
2.4. Caracterização da endometrose.....	18
2.5. Decorina	19
2.6. CD147	19
2.7. Imunohistoquímica.....	20
2.8. Western blot	21
3. Materiais e métodos	23
3.1. Imunohistoquímica.....	23
3.2 Western Blot.....	25
3.3 Análise estatística.....	26
4. Resultados e discussão	28
4.1 Imunohistoquímica.....	28
4.2 Western blot	31
III. Trabalho experimental 2 - Avaliação da qualidade do sémen de cavalo de raça Garrana, após preservação	34
1. Objectivos.....	34
2. Revisão bibliográfica.....	34
2.1 Anatomo-fisiologia do aparelho reprodutor do garanhão	34
2.2 O sémen equino	35
2.3 Obtenção do sémen	36
2.4 Conservação do sémen	36
3. Materiais e métodos	38
3.1 Colheita e processamento do sémen.....	38
3.2 Avaliação do sémen	39
3.3 Análise estatística dos dados	40
4. Resultados e discussão	41

IV. Conclusão.....	49
V. Bibliografia.....	51

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do útero da égua (adaptado de Kenney, 1978).	17
Figura 2. Imagens de imunohistoquímica de endométrios incubados com anticorpo anti-Decorina. Endométrios do tipo I, com Decorina (a), do tipo I, com IgG (b), do tipo I com PBS (c), do tipo IIA, com Decorina (d), do tipo IIA, com IgG (e), do tipo IIB, com Decorina (f), do tipo IIB, com IgG (g), do tipo III, com Decorina (h), do tipo III, com IgG (i) e do tipo III, com PBS (j). Anticorpo anti-Decorina foi diluído a 1/400.	28
Figura 3. Imagens de imunohistoquímica de endométrios do tipo I incubados com anticorpo anti-CD147 diluído a 1/50 (a) e a 1/100 (b); do tipo I, com PBS (c), do tipo III, com CD147 diluído a 1/50 (d) e do tipo III, com PBS (e).	29
Figura 4. Imagens de imunohistoquímica de endométrio de égua incubados com anticorpos anti-colagénio (COL). Endométrios do tipo IIA, com COL1 (a), do tipo IIA, com COL3 (b), do tipo IIA, com IgG (c), do tipo IIA, com leite (d), do tipo IIB COL1 (e), do tipo IIB, com COL3 (f), do tipo IIB, com IgG (g), do tipo IIB, com leite (h), do tipo III com COL1 (i), do tipo III com IgG (j), tipo III, com leite. Anticorpos anti-COL1 e anti-COL3 foram diluídos a 1/250.	30
Figura 5. Membrana de western-blot após incubação com anti-corpo anti-Decorina.	31
Figura 6. Expressão proteica relativa do colagénio do tipo I (COL1) em extratos proteicos de endométrios saudáveis (tipo I) e com diferentes graus de inflamação e fibrose (tipo II e III). Histogramas correspondem a imagens densitométricas do COL1 normalizadas com a β -actina. Barras correspondem a valores médios \pm desvio padrão. UA-unidades arbitrárias. Painéis superiores ilustram bandas representativas obtidas no western blot.	32
Figura 7. Expressão proteica da α -actina do músculo liso (α -SMA) em extratos proteicos de endométrios saudáveis (tipo I) e com diferentes graus de inflamação e fibrose (tipo II e III). Histogramas correspondem a imagens densitométricas de α -SMA normalizadas com a β -actina. Barras correspondem a valores médios \pm desvio padrão. UA-unidades arbitrárias. Painéis superiores ilustram bandas representativas obtidas no western blot.	33
Figura 8. Esquema dos oito tratamentos realizados em cada ejaculado.	39

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados da análise do sémen em natureza.	41
Tabela 2. Vitalidade (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), nos diferentes tratamentos estudados.	43
Tabela 3. Concentração (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), nos diferentes tratamentos estudados.	44
Tabela 4. Mobilidade (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), nos diferentes tratamentos estudados.	45
Tabela 5. Total de espermatozoides sem anomalias morfológicas (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), dos diferentes tratamentos estudados.	46
Tabela 6. Total de espermatozoides com anomalias (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), dos diferentes tratamentos estudados.	47
Tabela 7. Espermatozoides com anomalias na cabeça (%), na peça intermédia (PI) (%) e na peça principal (PP) (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), dos diferentes tratamentos estudados.	48

I. Introdução geral e objetivos

Os cavalos e os seres humanos partilham uma relação próxima há uns milhares de anos e tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da nossa sociedade, continuando nos dias de hoje a partilhar atividades como a agricultura, entretenimento, terapia e desporto.

Os problemas de fertilidade são vários, tanto da parte das fêmeas como dos machos. Nas éguas a saúde do útero é um fator determinante para a fertilidade da égua (Kenney, 1978). Durante a vida reprodutiva, o endométrio é sujeito a várias agressões que podem levar ao aparecimento e desenvolvimento de alterações, que gradualmente diminuem a capacidade de funcionamento do endométrio, podendo levar à infertilidade (Silva *et al.*, 1987).

Neste estudo é abordada a endometrose, condição degenerativa crónica do endométrio da égua, a qual está associada a problemas reprodutivos nesta espécie animal há várias décadas (Kenney, 1978). Esta é caracterizada pelo aumento na produção e acumulação de componentes da matriz extracelular e consequente desenvolvimento de fibrose, sendo o resultado final que se inicia com uma lesão e inflamação celular (Chambers, 2008). A Decorina e o Cluster de Diferenciação (CD147) são proteínas da matriz extra-celular que parecem estar envolvidas no desenvolvimento de fibrose em outros órgãos e espécies (Krusius and Ruoslahti, 1986; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Yamaguchi and Ruoslahti, 1988; Border *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.* 1990; Simon-Chazottes *et al.*, 1992; Kasinrerker *et al.*, 1992; Saxena *et al.*, 2002; Biswas *et al.*, 1995). A expressão proteica destas proteínas no endométrio equino ainda não foi referida. Assim, neste estudo objetivou-se avaliar a expressão destas duas proteínas da matriz extra-celular no endométrio saudável e com diferentes graus de inflamação e de fibrose da égua.

Nos equinos como a seleção dos reprodutores se baseia em características fenotípicas e na performance atlética do animal e não na qualidade das características reprodutivas, leva a um problema na fertilidade, uma vez que o sémen do garanhão pode ser de baixa qualidade, pelo que são necessárias melhores estratégias de processamento do sémen para aumentar a qualidade do mesmo (Brinsko *et al.*, 2007). A refrigeração e a congelação são técnicas correntemente usadas para preservar a qualidade e consequente fertilidade do sémen em reprodução dos equinos. No entanto, nem todos os ejaculados têm a mesma qualidade e nem todos os espermatozoides toleram o arrefecimento do mesmo modo e por isso, os métodos de processamento devem ser adequados e específicos para os diferentes tipos de sémen (Alvarenga *et al.*, 1996). Assim, num segundo estudo pretendeu-se avaliar o efeito de

diferentes procedimentos de congelação sobre a qualidade do sémen de um cavalo de raça Garrano.

II. Trabalho experimental 1 – Expressão da Decorina e da CD 147 no endométrio da égua

1. Objetivos

Este estudo teve como objectivo avaliar a presença de duas proteínas da matriz extra-celular, a decorina e o CD147, em cortes histológicos de biopsia de endométrio equino saudável e com fibrose. Foram ainda avaliadas nesses mesmos tecidos a expressão do colagénio tipo I (COL 1) e do tipo III (COL 3) e da α -actina do músculo liso (“ α -smooth muscle actin”, α -SMA). A avaliação foi feita com as técnicas de imunohistoquímica e western blot, sendo também outro objetivo a aprendizagem destas técnicas de biologia molecular para quantificar e detetar proteínas em tecidos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Anatomo-fisiologia do aparelho reprodutor da égua

A reprodução nas éguas é um processo complexo onde todo o organismo participa, sendo o aparelho reprodutor feminino responsável pelo ciclo éstrico, pelo comportamento sexual da égua e pelo controlo da gestação, do nascimento e da lactação (Silva, 2009). Este aparelho compreende os ovários, as trompas uterinas, o útero, a vagina e a vulva. O ovário liberta o óvulo para as trompas uterinas, que depois é levado até ao corno uterino, onde ocorre a fecundação. No útero, o óvulo fecundado transforma-se em embrião e depois em feto. Na altura do parto este é expulso pela vagina e vulva, como um poldro recém-nascido (Silva, 2009).

A reprodução dos equinos é sazonal, sendo a primavera e o verão os períodos mais férteis, de março a setembro. Como a gestação é de aproximadamente 11 meses, os poldros evitam o frio do inverno e encontram melhores condições ambientais nos primeiros meses de vida (Silva, 2009).

O período em que os órgãos reprodutivos começam a tornar-se funcionais, chama-se puberdade, e na égua ocorre entre os 10 aos 24 meses. A função ovárica compreende a oogénese, a ovulação e a formação do corpo lúteo. Estes processos que ocorrem nos ovários influenciam outras partes do sistema reprodutor de uma forma cíclica, que se conhece por ciclo éstrico (Silva, 2009).

O ciclo éstrico é o período entre a ovulação de um folículo maduro até à ovulação do folículo maduro seguinte. Nas éguas dura cerca de 21 a 22 dias, podendo também variar dos 18 e 24 dias. Este ciclo compreende as fases de pró-estro, estro, metaestro e diestro. O pró-estro é o período de preparação onde os folículos aumentam de tamanho, as paredes vaginais tornam-se mais espessas e o útero aumenta as suas secreções mucosas. O estro engloba o período de cio em que a fêmea está recetiva ao macho, e dura em média 5 dias, tendo, no entanto, grandes variações individuais. A ovulação dá-se 24 a 48 horas antes do final do estro. O metaestro é quando se forma o corpo lúteo, com alterações nas paredes vaginais e uterinas; o diestro dura cerca de 14 dias. Sendo as éguas animais poliéstricos sazonais, têm vários ciclos éstricos sucessivos seguidos de um período de inatividade sexual denominado de anestro (Silva, 2009).

Quando ocorre gestação as fases sucessivas são a fecundação, por união do óvulo com o espermatozoide, a implantação do embrião na parede uterina, a formação das membranas fetais (placenta) e o crescimento gradual do feto. O período médio de gestação da égua é de 336 dias (Silva, 2009).

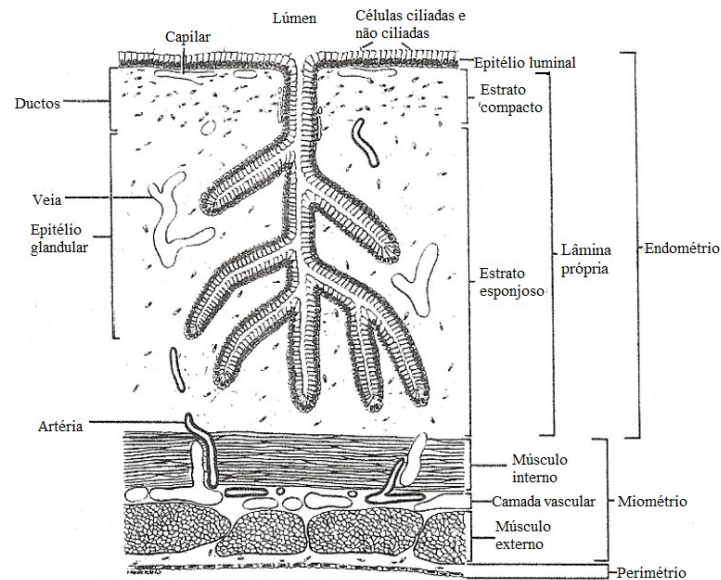
2.2. O endométrio equino

O útero é formado por dois cornos uterinos, corpo e cérvix. O cérvix consiste num esfíncter resistente de músculo liso, este encontra-se, normalmente, fechado, exceto durante o período de cio e no parto.

Histologicamente, o útero da égua é formado por três camadas; o perimétrio, o miométrio e o endométrio (Kenney, 1978; Masseno, 2012). O perimétrio representa a serosa que reveste externamente o útero. O miométrio, corresponde à camada intermédia muscular da parede uterina e desenvolve-se muito durante a gestação, ocorrendo um aumento do volume das células e a sua multiplicação. O endométrio corresponde à membrana mucosa que reveste internamente o útero, sendo um tecido muito glandular cuja vascularização e espessura dependem das variações hormonais que ocorrem ao longo do ciclo éstrico e durante a gestação (Silva, 2009).

No endométrio equino podemos distinguir dois componentes, o epitélio luminal (superficial) e a lâmina própria (Figura 1), cuja aparência varia com a fase do ciclo éstrico (Kenney, 1978). A lâmina própria estende-se desde a membrana basal do epitélio luminal até ao miométrio (Kenney, 1978). No epitélio luminal existem células ciliadas e não ciliadas. Ao nível da lâmina própria, com base na densidade de células do estroma, distinguem-se duas camadas:

(i): o estrato compacto, a seguir ao epitélio luminal, com uma densidade de células do estroma relativamente elevada; e (ii) o estrato esponjoso, que tem uma densidade celular mais baixa, com muitas fibras (Kenney, 1978). Na lâmina própria há numerosas glândulas uterinas, que



estão ligadas à superfície luminal por ductos (que se estendem e ramificam até ao estrato esponjoso), vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Kenney, 1978). O epitélio luminal e o epitélio glandular produzem secreções denominadas de histotrofo que são importantes nas fases iniciais de gestação (Kenney, 1978).

Figura 1: Representação esquemática do útero da égua (adaptado de Kenney, 1978).

2.3. A endometrose na égua

A endometrose ou fibrose do endométrio da égua, tem vindo a ser associada a problemas reprodutivos na égua há várias décadas e é característica em éguas de mais idade (Kenney, 1978).

A endometrose ou fibrose do endométrio da égua é uma condição degenerativa crónica caracterizada por um aumento na produção e acumulação de componentes da matriz extracelular, nomeadamente de fibras de colagénio, sobretudo do tipo I (Chambers, 2008). As lesões fibróticas podem estar localizadas no estrato esponjoso, envolvendo a base das glândulas, resultando em ninhos fibróticos ou no estrato compacto envolvendo os ductos das glândulas o que leva à formação de cistos (Amaral, 2002).

A biópsia do endométrio é o melhor método para diagnosticar a endometrose (McKinnon, 1988; Kenney, 1978). Entre as alterações encontradas por este método de diagnóstico podem

citar-se as inflamações, a fibrose, a hipertrofia, glândulas císticas, a atrofia e as hipoplasias (Kenney, 1978).

No endométrio das éguas, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas mostram grande imuno-reatividade para a proteína α -actina músculo liso (α -SMA- α -smooth muscle actin), cuja expressão é ainda mais evidente nos miofibroblastos que circundam as glândulas císticas (Walter *et al.*, 2001). Os miofibroblastos são responsáveis pelas principais características da fibrose ativa (Masseno, 2010), contribuem para a destruição do tecido e gradual degradação das funções do órgão afetado, havendo evidências de que a produção de colagénio pelos fibroblastos seja uma consequência da diferenciação destes em miofibroblastos (Petrov *et al.*, 2002). A α -SMA é um marcador usado para determinar a presença e atividade dos miofibroblastos (Hinz, 2007; Lemoine *et al.*, 2013).

2.4. Caracterização da endometrose

Kenney e Doig (1986) classificaram os graus de lesões do endométrio da égua em quatro categorias (I, IIA, IIB e III) de acordo com a presença, distribuição e intensidade das lesões. Com base nesta classificação, o tecido de um endométrio saudável é classificado na categoria I, a categoria II corresponde a alterações moderadas com formações de alguns ninhos glandulares e havendo hiperplasia e hipertrofia do epitélio glandular. O que faz com que a categoria IIA passe a ser IIB são a égua apresentar falhas reprodutivas por mais de dois anos consecutivos, haver mais de uma alteração presente, uma vez que as mudanças são aditivas e as alterações fibróticas são mais extensas e graves do que a categoria IIA. A categoria III corresponde a uma inflamação grave e fibrose periglandular acentuada, demonstra mudanças severas e irreversíveis no útero. Neste sistema de classificação quanto maior o grau menor é a possibilidade de haver gestação (Kenney e Doig, 1986).

As fases de evolução do processo fibrótico foram descritas por Hoffmann *et al.*, em 2009, que denominaram as etapas de fibrose em: ativa, ativa destrutiva, inativa e inativa destrutiva. As fibroses ativas caracterizam-se pela presença de células do estroma fibróticas metabolicamente funcionais. Nas fibroses inativas as células do estroma apresentam-se metabolicamente disfuncionais, nas fibroses ativa e inativa destrutivas implica a invasão do lúmen glandular pelas células do estroma, resultando na degenerescência e necrose das células epiteliais (Hoffman *et al.*, 2009).

2.5. Decorina

A decorina é uma proteína da família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (small leucine-rich proteoglycan) presente na matrix extracelular. O seu nome vem da sua forte interação com as fibras de colagénio presentes na matrix extracelular, em que ela “decora” estas fibras de colagénio (Krusius e Ruoslahti, 1986).

Para além da sua função como componente da estrutura da matrix extracelular, a decorina influencia outras funções nas células, tais como a proliferação, multiplicação, migração e diferenciação, assim como parece ter um papel regulador da inflamação (Krusius e Ruoslahti, 1986; Yamaguchi e Ruoslahti, 1988; Yamaguchi *et al.* 1990; Ruoslahti e Yamaguchi, 1991; Border *et al.*, 1992).

A decorina interage com o Fator de transformação do crescimento- β (TGF- β - Transforming growth factor- β), inibindo a multiplicação e proliferação das células cancerígenas (Yamaguchi *et al.* 1990). Também foi comprovado em várias espécies animais que é capaz de reduzir tecidos fibróticos e inflamações causadas pelo TGF- β (Border *et al.*, 1992; Border e Ruoslahti, 1992; Zhu *et al.*, 2007; Jarvinen e Ruoslahti, 2010; Mohan *et al.*, 2011; Jarvinen e Ruoslahti, 2013).

Segundo Carrino *et al.* (2012), os fibróides uterinos (tumores benignos do tecido muscular liso do miométrio) e as cicatrizes quelóides contêm quantidades relativas menores de decorina, quando comparados com tecidos saudáveis.

2.6. CD147

O cluster de diferenciação 147 (CD 147) também denominado de Basigin, é uma glicoproteína transmembranar, membro da superfamília das imunoglobulinas. Foi primeiramente denominado de Fator estimulador da colagenase das células tumorais (TCSF- tumor cell collagenase stimulatory factor), depois passou para indutor da matrix extracelular de metaloproteinases (EMMPRIN- extracelular matrix metalloproteinase inducer), sendo responsável pela produção de várias metaloproteinases (Kasinrerk *et al.*, 1992; Simon-Chazottes *et al.*, 1992; Biswas *et al.*, 1995; Saxena *et al.*, 2002).

Está presente em vários tecidos e células incluindo os fibroblastos (Lee *et al.*, 2010; Tyker *et al.*, 2012). Participa em várias funções celulares, tais como migração, movimentação e apoptose (Iocono *et al.*, 2007; Weidle *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Estudos revelaram que o CD 147 foi encontrado nos ovários (Smedt e Curry, 2005), no útero

(Kuno *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2003), no endométrio (Braundmeier *et al.*, 2006) e em tecido fibroso nos ovários (Smedts *et al.*, 2006).

O basigin foi intensivamente estudado e estabelecido como um regulador de migração e causador da sobrevivência de células cancerígenas (Chen *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Hadler-Olsen *et al.*, 2013; Brezilion *et al.*, 2013; Fok *et al.*, 2014).

Segundo um estudo de Payne *et al.* (2011), o CD 147 promove a fibrose nos pulmões o que por sua vez faz questionar a relação que esta glicoproteína poderá ter com a endometrose. Num estudo recente de perfil de transcrição do endométrio de éguas com diferentes graus de fibrose (Fiorenza, 2017), nos casos de fibrose tipo III, a transcrição de mRNA de *CD147* é maior do que nos endométrios de tipo I.

2.7. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é usada na pesquisa de antígenos nas células ou tecidos (Brandtzaeg, 1998). É uma ferramenta muito importante em investigação científica e também uma técnica complementar a diferentes diagnósticos que não se conseguem realizar usando o método convencional de análise com hematoxilina e eosina (Leong *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 1994; Rosai, 1997; Alves *et al.*, 1999; Hsi, 200; Bodey, 2002). Apesar de ser uma técnica relativamente simples tem algumas desvantagens e depende de alguns fatores, sendo importante que a pessoa que esteja a fazer o ensaio tenha experiência na realização do método e na leitura e interpretação dos resultados (Leong *et al.*, 1987; Rosai, 1997; Alves *et al.*, 1999; Werger *et al.*, 2000; Jaffer *et al.*, 2004).

Esta técnica abrange muitos métodos usados para determinar antígenos (componentes do tecido) com o uso de anticorpos específicos que são demonstrados por marcações acastanhadas (Brandtzaeg, 1998; Haines *et al.*, 2005). Compreende duas fases: primeiro, a preparação das lâminas com o tecido, as reações para recuperação antigénica e as incubações com os anticorpos primários e secundários; segundo, a interpretação e quantificação dos resultados (Alves *et al.*, 1999).

O tecido é primeiramente fixado em formaldeído e parafinado. Este procedimento é usado internacionalmente e alguns especialistas propõem que seja um procedimento que deve ser padronizado para comparar diagnósticos (Wick, 1995). Contudo, a fixação em formaldeído leva a perdas de imunorreatividade, uma vez que impede o acesso e destrói alguns sítios de ligação dos anticorpos (Rickert *et al.*, 1989).

A escolha do anticorpo correto é um fator determinante para melhores resultados na imunohistoquímica (Alves *et al.*, 1999). Os anticorpos primários são divididos em duas categorias policlonais e monoclonais. Os policlonais, podem ser obtidos do soro de animais imunizados, por exemplo, coelho, cabra, macaco, rato, e reconhecem muitos epítomos do mesmo antigénio, tendo maior sensibilidade na sua deteção. Os monoclonais são desenvolvidos a partir de hibridomas e dão origem a anticorpos que apenas se ligam a um epítomo de antigénio, dando resultados mais específicos (Nadji, 1986; Brandtzaeg, 1998; Lipman *et al.*, 2005).

A interpretação dos resultados geralmente é feita a nível qualitativo, quantitativo e de uma maneira subjetiva. Na maioria dos casos um resultado positivo é quando há presença de marcação acastanhada (True, 1988; Elias, 1990; Becker, 1993; Seidal *et al.*, 2001). O uso de IgG (produzido na mesma espécie do anticorpo primário) é necessário para o despiste de ligações inespecíficas (Seidal *et al.*, 2001).

2.8. Western blot

O western blot é muitas vezes referido como imunoblot. Esta técnica envolve a separação das proteínas por eletroforese em gel (pela sua estrutura tridimensional no caso das proteínas nativas ou pelo comprimento da sua cadeia polipeptídica, no caso das proteínas desnaturadas), a sua transferência para uma membrana e seguidamente a deteção da proteína que se pretende identificar com o uso de anticorpos específicos para essa proteína (Gomes *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2009).

Esta técnica é uma ferramenta analítica essencial para identificar a proteína de interesse numa mistura complexa. Os resultados podem ser usados como semi-quantitativos, para determinar e comparar a expressão da proteína específica em várias células e tecidos (Kurien *et al.*, 2006), ou podem ser quantitativos, mas necessita de uma curva padrão da proteína específica (Murphy *et al.*, 2009).

Esta técnica tem a vantagem de poder ser usada como uma ferramenta de diagnóstico prévio, é específica e sensível (Canelle *et al.*, 2005; Bertoni *et al.*, 2012). Porém tem algumas limitações, tais como não consegue suportar mais que um anticorpo primário para a proteína de interesse e alguns anticorpos interagem com outras proteínas sem ser a de interesse, o que pode levar a falsos-positivos. É também necessário o uso adequado de quantidades de amostra e de anticorpo (Towbin *et al.*, 1979; Smejkal *et al.*, 1994; Koller *et al.*, 2005; Kurien *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2013).

Na quantificação das bandas geradas pelo western blot é comum usar uma proteína referência chamadas de “housekeeping proteins”. Estas proteínas têm uma expressão constante nos tecidos, pelo que alguns investigadores também as usam como “loading control”. As mais usadas são a β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina (Dittmer *et al.*, 2006; Eaton *et al.*, 2013; Gilda *et al.*, 2013). Para uma otimização da quantificação use-se o Chemidoc MP (Bio-Rad) e o programa ImageLab que contém as ferramentas de análise para a quantificação e determinação dos pesos moleculares da proteína, determinando os níveis de intensidade de cada linha (Gassman *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2013).

Materiais e métodos

Este estudo foi realizado no laboratório Valoren, da Escola Superior Agrária de Coimbra.

3.1. Imunohistoquímica

3.1.1 Caracterização da amostra

No estudo imunohistoquímico foram usados um total de 70 cortes histológicos do endométrio de égua com diferentes graus de fibrose periglandular e inflamação. Estes foram classificados de acordo com o sistema de Kenney e Doig (1986) em endométrios do tipo I (n=15), tipo IIA (n=12), tipo IIB (n=8) e tipo III (n=35).

3.1.2 Procedimento da imunohistoquímica

Esta técnica foi usada para detetar a presença da decorina, do CD147 e dos colagénios do tipo 1 (COL1) e tipo 3 (COL3).

As lâminas com cortes histológicos de endométrio de 4 µm foram colocadas numa estufa a 57°C, durante 10 min, sendo posteriormente submetidas a um processo de desparafinização, por imersão das lâminas em cubas de vidro com xilol, à temperatura ambiente, primeiro durante 20 min e depois 15 minutos. Este foi seguido da hidratação dos tecidos, por imersão dos mesmos em concentrações decrescentes de etanol (2 vezes em etanol 100%, durante 2 minutos; 2 vezes em etanol 95%, durante 2 minutos; 2 vezes em etanol 70%, durante 2 minutos) e finalmente em água destilada durante 5 minutos.

Na deteção da Decorina e do CD 147 e para fazer o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas em H₂O₂, a 0,3%, durante 15 min com agitação. A recuperação do antigénio, necessária para libertar os epítomos antigénicos do tecido, foi feito com tampão citrato a pH= 6 ou com tampão ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a 1mM. O tampão com as lâminas imersas foi aquecido (96°C) em micro-ondas, durante 15 min. Arrefeceram-se as lâminas gradualmente em gelo. Seguidamente foi feito o bloqueio dos locais de ligação inespecífica, colocando sobre os tecidos, 100 µl de soro de cabra (Goat Serum, Ref.: G-9023, Lot.:118H9063, Sigma Chemical Co., MO, USA) a 5% em PBS, sendo posteriormente incubados durante 45 min, à temperatura ambiente, numa caixa escura húmida. Após o bloqueio foi feita a incubação com os anticorpos primários, de decorina (LS-B6704, LS Bio, produzido em coelho; diluído a 1/400 ou 1/100,) e do CD 147 (NB500-430, Novus

Biologicals, anticorpo monoclonal produzido em rato; diluído a 1/100 ou 1/50). Os anticorpos foram diluídos em PBS e foram aplicados 100 µl por lâmina, sendo uniformemente distribuídos por toda a superfície do corte. As lâminas ficaram a incubar durante a noite (14 a 18 horas) em câmara húmida, a 4°C. Os controlos negativos foram realizados substituindo o anticorpo primário por IgG de coelho (rabbit polyclonal IgG, ab 27478, Abcam, diluída a 1/100) ou por PBS, usando as mesmas condições de incubação, com a finalidade de identificar ligações inespecíficas. No dia seguinte, os tecidos foram lavados em PBS durante 20 min e foram incubados com 100 µl de anticorpo secundário “Anti-rabbit” (P0448, DAKO; diluído a 1/100) ou “anti-mouse” (A2554, Sigma; diluído a 1/100), numa caixa preta seca durante 1 h, à temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram lavadas em PBS durante 10 minutos e foram coradas com 100µl de uma solução cromogénica de diaminobenzidina (DAB; ab 642381, Abcam) durante 1 min, ao abrigo da luz. As lâminas foram lavadas em água durante 5 min e foi feito o contraste com hematoxilina de Meyer. Após nova lavagem em água destilada durante 5 min, os tecidos foram desidratados por imersão em etanol (70% durante 2 min; 95% durante 2 min; 100% durante 3 min; 100% durante 5 min;) e xilol (2 vezes durante 5 minutos), procedendo-se à montagem das lamelas com entellan.

Na deteção de colagénio 1 e 3, foi usado um protocolo de recuperação enzimática do antigénio, com uma solução pepsina a 1%, pH=1,8. As lâminas desparafinadas foram pré-aquecidas, numa cuba com água ácida pH=1,8, a 60°C. Foram aquecidas duas cubas com a solução de pepsina ácida: (i) uma a 60°C, onde as lâminas ficaram durante 3 min numa estufa a 60°C e (ii) outra a 37°C, para onde foram transferidas as lâminas por mais 10 min, numa estufa a 37°C. Para parar a ação da pepsina, os tecidos foram posteriormente lavados em água destilada durante 3 minutos e PBS 2 vezes durante 5 minutos e procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de H₂O₂ 3%, durante 20 minutos. Foi aplicado o leite magro 3% (Skim milk powder, Ref.: RM1254-500G, HIMedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, India) para bloquear os locais de ligação inespecífica, durante 45 min, à temperatura ambiente, em câmara húmida escura. Incubou-se os anticorpos primários de colagénio 1 (ref. 20121, Novotec; diluído a 1/1000 e 1/250) e de colagénio 3 (ref. 20321, Novotec; diluído a 1/500 e 1/250) durante a noite (14 a 18 h), a 4 °C, numa câmara húmida escura. No dia seguinte, os tecidos foram incubados com anticorpo 2º de “anti-rabbit” (P0448, DAKO; diluído a 1/100) durante 1 h à temperatura ambiente, em camara escura seca. Todos os restantes passos foram idênticos aos descritos anteriormente.

3.2 Western Blot

3.2.1. Caracterização da amostra

Neste método de análise foram utilizados os extratos de proteínas obtidos de biópsias de endométrio com diferentes graus de fibrose e previamente extraídos com tampão RIPA e na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

3.2.2. Quantificação da concentração de proteína

A concentração da proteína total dos extratos proteicos preparados a partir de amostras de endométrio com diferentes graus de fibrose, foi quantificada pelo método de Bradford (ref: 500-0006, Rio-rad, CA, USA).

As amostras de sobrenadante foram diluídas a 1/400 (2 µl, 800 µl de H₂O) e após a adição de Bradford (200 µl), os valores de absorvância resultantes da leitura realizada, num espectrofotómetro (T80+, UV/VIS spectrometer, PG Instruments LTD), a $\lambda = 550$ nm, foram comparados com os de uma curva padrão de soro-albumina bovina (BSA).

3.2.3. Procedimento do Western Blot

Para fazer a separação das proteínas por eletroforese, foram preparados no laboratório os géis de poliacrilamida a 10 % (9,65 ml de H₂O, 5,23 ml de 4x lower buffer, 4,95 ml de acrilamida 20 %, 198 µl de APS 10% e 19,8 µl de TEMED), que após solidificação durante 30 minutos, se juntou uma solução de concentração de acrilamida a 4% e deixou-se secar durante 1 hora.

Preparam-se as amostras em eppendorffs, previamente identificados e furados, num volume final de 30 µl (volume de amostra, água e loading buffer). Após a desnaturação das proteínas numa manta quente a 95° durante 5 min, foram arrefecidas em gelo durante 5 min.

Os géis foram colocados no suporte de uma tina de eletroforese, e após se ter adicionado o tampão corrida 1 vez (900ml de H₂O, 100ml de tampão corrida 10 vezes (30,3g tris-base; 144g Glicina, 10g SDS, 800ml H₂O elix) até cobrir completamente os géis, foram carregadas 30 µl de amostra e/ou 5 µl de marcador, em cada poçilho dos géis. Ligou-se a fonte a 80V durante 15 a 20 min (até passarem o gel de concentração) e depois passa-se para 120 V durante 1h a 1h30min. A corrida termina quando as amostras saírem para fora do gel.

Para efetuar a transferência do gel para a membrana, os filtros (spacers), as esponjas e os suportes de plástico foram humedecidos em tampão de transferência (100ml de tampão de corrida 10x, 200ml de H₂O, 200ml de metanol, 500ml de H₂O). A membrana foi mergulhada

em tampão de transferência numa caixa à parte. Corta-se o gel de concentração e destaca-se o gel do vidro com este mergulhado no mesmo tampão. Monta-se a “sandwich” em cima do lado preto na seguinte ordem: esponja, filtro, gel, membrana, filtro e esponja. Coloca-se a “sandwich” no suporte da tina de transferência e enche-se com tampão de transferência. Seguidamente, põe-se a tina de transferência numa caixa de esferovite com gelo em redor. Após a transferência a 100 V, durante 2 horas, faz-se a lavagem das membranas em água destilada várias vezes. Procede-se ao bloqueio das membranas com leite 5% em PBS, durante 45 min à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: CD147 (diluído a 1/1000 e 1/500), Decorina (diluída a 1/1000, 1/500 e 1/250), Colagénio 1 (diluído a 1/1000), α -smooth muscle actin (α -SMA; Abcam, ab15734; diluído a 1/1000 e 1/500) e β -actina (Sigma 5441; diluído a 1/10000). Preparam-se 3 ml de anticorpo primário em PBS, fazem-se sacos de plástico do tamanho da membrana, coloca-se a membrana e os 3 ml de anticorpo no saco e sela-se o saco. No caso do CD147, decorina, colagénio e α -SMA tem que incubar durante a noite num agitador, a 4°C. No caso da β -actina vai a incubar durante 1,5 h, à temperatura ambiente.

Depois de se incubar o anticorpo primário procedem-se lavagens com água, tampão de lavagem (Tween 1%, em PBS) e mais lavagens com água.

Seguidamente, é incubado o anticorpo secundário em sacos. Para o CD147 e Decorina a diluição usada foi de 1/1 000 de anti-mouse ou anti-rabbit durante 2 h, à temperatura ambiente. Para o colagénio 1 usou-se diluição de 1/20 000 de anti-rabbit durante 1,5 h. Para o α -SMA foi usada uma diluição de 1/1 000 de anti-rabbit durante 1 h à temperatura ambiente e para a β -actina uma diluição de 1/5 000 de anti-mouse durante 1 h à temperatura ambiente. No final da incubação procedem-se às lavagens com água e com o tampão de lavagem.

Para a revelação aplica-se Femto (Thermo Scientific, SuperSignal® West Femto Maximum Sensivity Substrate, B2160738) diretamente na membrana durante 1 min. Dispõem-se as membranas numa mica, retiram-se as bolhas e procede-se à sua observação e análise no Chemidoc XRS4 (Bio-Rad Laboratories, Lda).

3.3 Análise estatística

Os dados obtidos na expressão proteica do COL1 por western blot foram submetidos a uma análise de variância para comparar as médias nos diferentes tipos de endométrio. Os resultados obtidos com o α -SMA foram analisados através do teste não paramétrico de

Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's. Foi utilizado o software GraphPadPrism 6.0 (Graph Pad Software Inc., USA). Foram considerados estatisticamente significativos valores com $P < 0,05$.

3. Resultados e discussão

4.1 Imunohistoquímica

Quando analisámos as lâminas incubadas com anticorpo anti-decorina (figura 2 a,d,f,h) pareceu haver marcações, no entanto, quando usámos a IgG (figura 2 b, e, g, i), verificou-se a existência de marcações nos mesmos locais que a decorina, demonstrando assim que as marcações são inespecíficas. A ausência de marcação nas lâminas incubadas com o outro controlo negativo (PBS; figura 2 c, j) indica que a técnica foi bem executada e os anticorpos usados funcionaram. Houve uma grande marcação com o DAB em comparação com a hematoxilina, o que nos deu um mau contraste, o que por sua vez tornou mais difícil a interpretação dos resultados. Na figura 2 pode-se verificar as diferenças entre a decorina, a IgG e o PBS em endométrios de éguas saudáveis, do tipo I, e com diferentes graus de inflamação e fibrose, do tipo IIA, IIB e III.

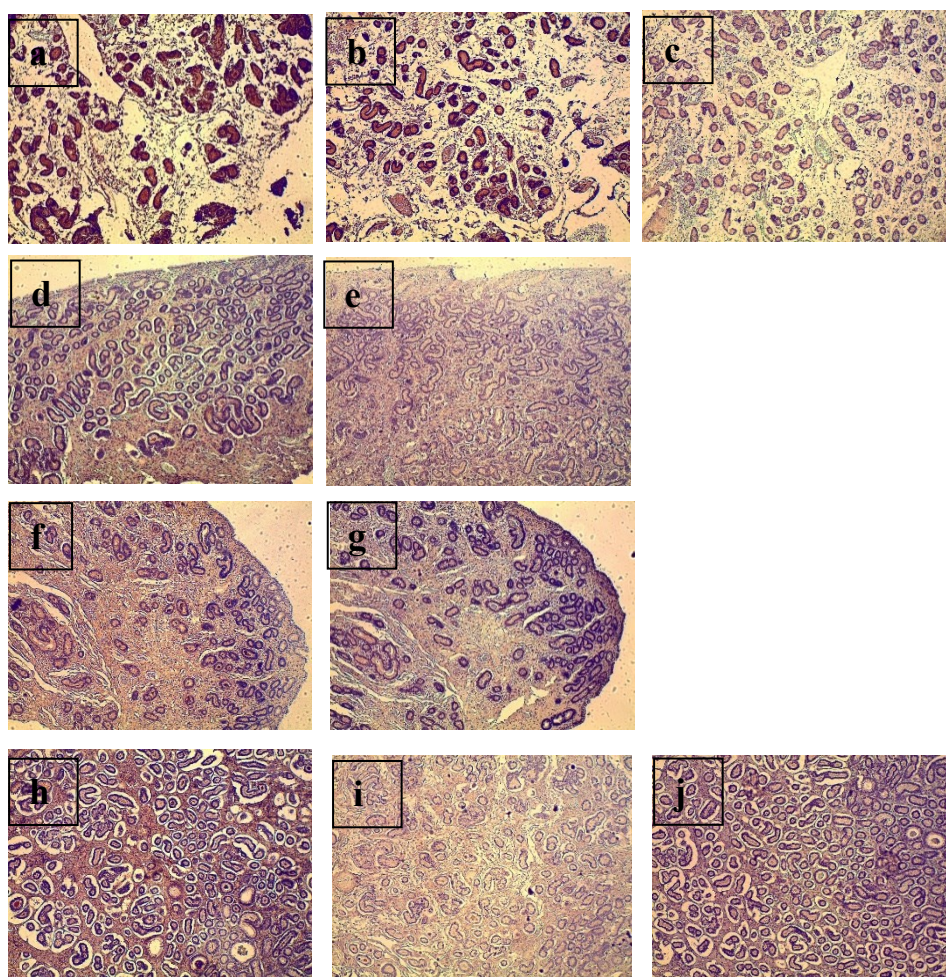


Figura 2. Imagens de imunohistoquímica de endométrios incubados com anticorpo anti-Decorina. Endométrios do tipo I, com Decorina (a), do tipo I, com IgG (b), do tipo I com PBS (c), do tipo IIA, com Decorina (d), do tipo IIA, com IgG (e), do tipo IIB, com Decorina (f), do tipo IIB, com IgG (g), do tipo III, com Decorina (h), do tipo III, com IgG (i) e do tipo III, com PBS (j). Anticorpo anti-Decorina foi diluído a 1/400.

Nos resultados obtidos por imunohistoquímica, não se observaram diferenças, entre o controle (PBS) e o CD147, nos endométrios de éguas com diferentes graus de endometriose. Como demonstrado na figura 3, não se registou qualquer tipo de marcação-do CD147, mesmo com diferentes diluições do anticorpo e endométrios de égua com diferentes tipos de graus de endometriose. Pode-se verificar também a grande marcação com o DAB em comparação com a hematoxilina, o que nos deu um mau contraste (figura 3 a,b).

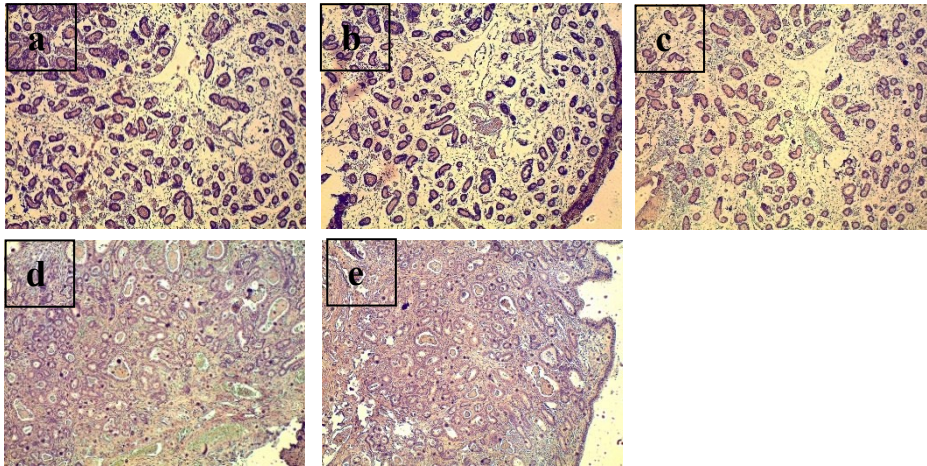


Figura 3. Imagens de imunohistoquímica de endométrios do tipo I incubados com anticorpo anti-CD147 diluído a 1/50 (a) e a 1/100 (b); do tipo I, com PBS (c), do tipo III, com CD147 diluído a 1/50 (d) e do tipo III, com PBS (e).

Foi feito também um ensaio para identificar o Colagénio do tipo I (COL1) e do tipo III (COL3) em tecidos de endométrio de éguas com diferentes tipos de grau de endometriose (Figura 4). No entanto, os resultados obtidos não nos permitem afirmar que a marcação obtida é específica, uma vez que a marcação evidenciada nos endométrios incubados com os anticorpos anti-COL1 (Figura 4 a,e,i) e anti-COL3 (Figura 4 b,f) não é diferente daquela obtida com a IgG (Figura 4 c,g,j) e há presença de marcação em zonas com tecido destruído.

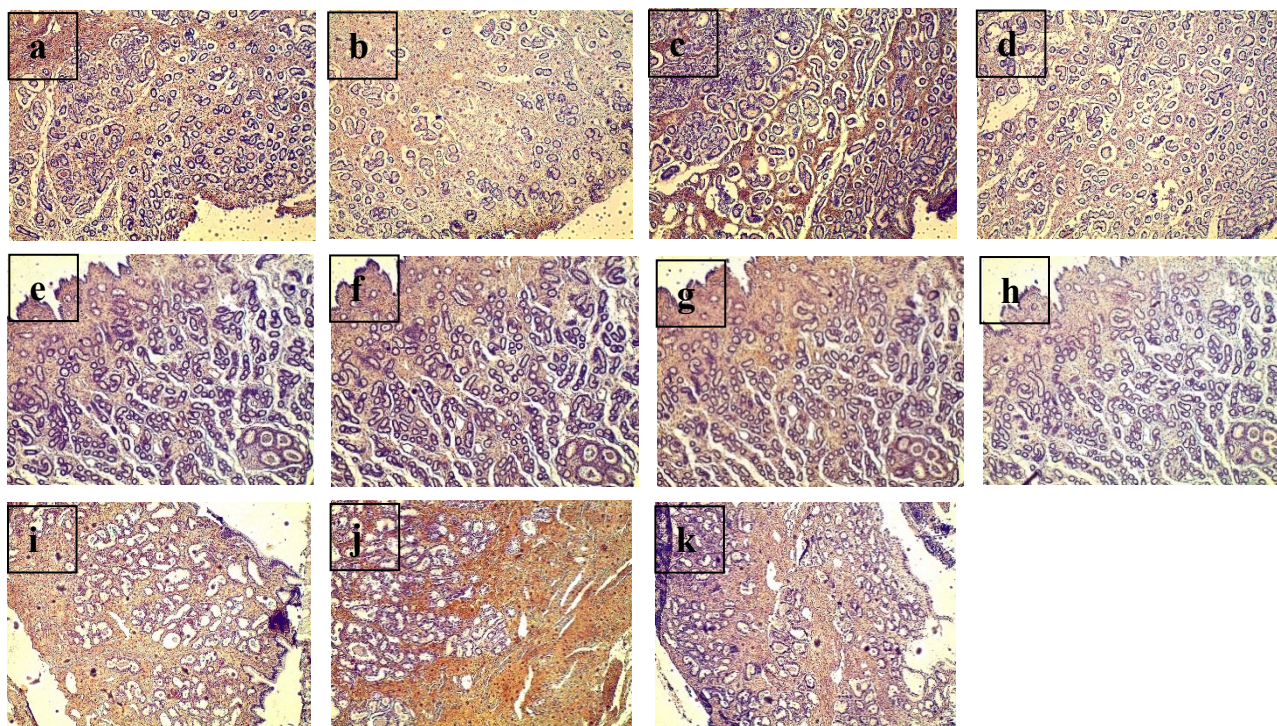


Figura 4. Imagens de imunohistoquímica de endométrio de égua incubados com anticorpos anti-colagénio (COL). Endométrios do tipo IIA, com COL1 (a), do tipo IIA, com COL3 (b), do tipo IIA, com IgG (c), do tipo IIA, com leite (d), do tipo IIB COL1 (e), do tipo IIB, com COL3 (f), do tipo IIB, com IgG (g), do tipo IIB, com leite (h), do tipo III com COL1 (i), do tipo III com IgG (j), tipo III, com leite. Anticorpos anti-COL1 e anti-COL3 foram diluídos a 1/250.

4.2 Western blot

Por Western-blot, pretendeu-se avaliar a presença da expressão proteica do CD147, da Decorina, do colagénio do tipo I e da α -SMA em extratos proteicos de endométrios com diferentes lesões de inflamação e fibrose.

Relativamente ao CD147, não foi possível a sua identificação no endométrio da égua, porque o anticorpo utilizado no estudo imunohistoquímico só permite a deteção de proteínas nativas e os extratos proteicos de endométrio usados nos ensaios de western-blot foram extraídos com um tampão que provocou a desnaturação das proteínas. Por motivos financeiros não nos foi possível adquirir outro anticorpo.

Também não nos foi possível identificar a presença de Decorina no endométrio da égua. Embora em algumas amostras das membranas incubadas com esse anticorpo (Figura 5), nos aparecesse uma banda (38kDa) compatível com a sua presença nos endométrios do tipo I e III, verificou-se que as proteínas identificadas nessas bandas, por espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF, realizada na Unidade de Espectrometria de Massa (UniMS), ITQB/iBET, não correspondiam à Decorina.

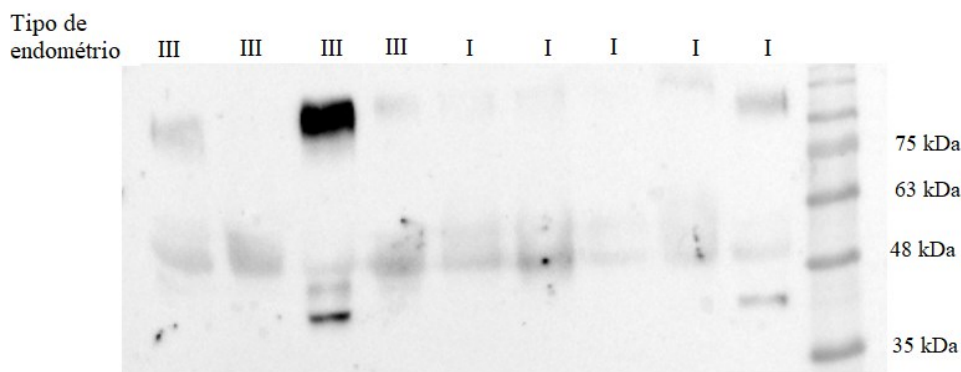


Figura 5. Membrana de western-blot após incubação com anti-corpo anti-Decorina.

Na figura 6 podemos verificar que embora exista uma tendência para a expressão de COL1 aumentar à medida que as lesões no endométrio aumentam, não foram detetadas diferenças significativas na intensidade da banda de COL1 (banda num peso molecular de 126 kDa) entre os diferentes tipos de endométrios ($P > 0.05$).

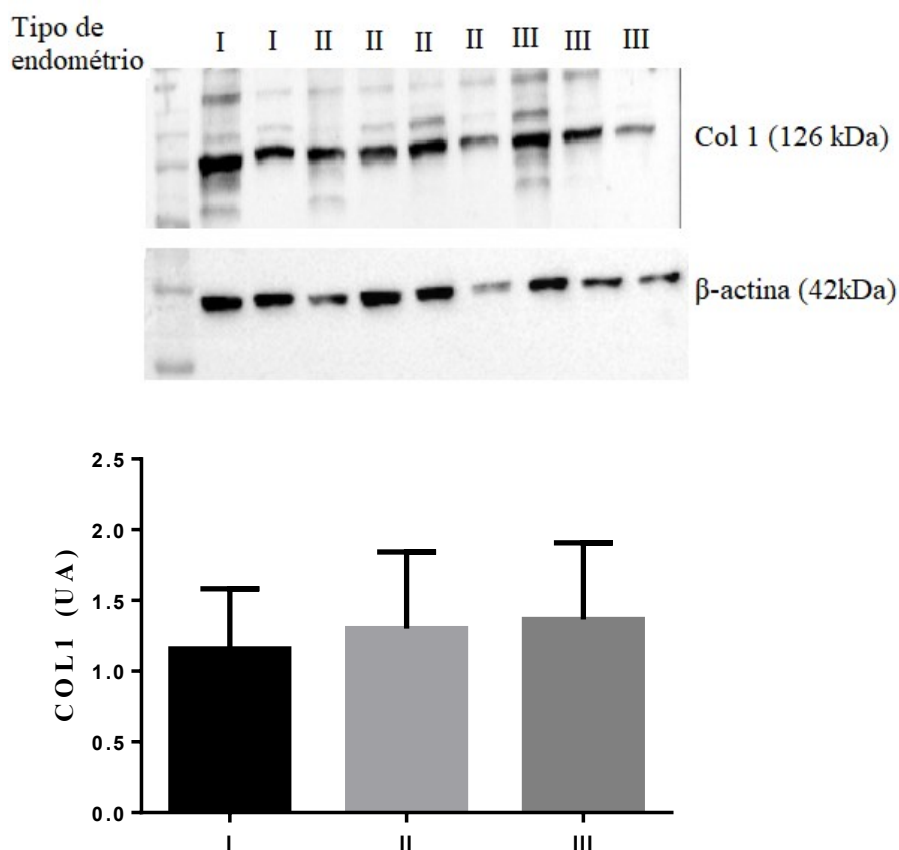


Figura 6. Expressão proteica relativa do colagénio do tipo I (COL1) em extratos proteicos de endométrios saudáveis (tipo I) e com diferentes graus de inflamação e fibrose (tipo II e III). Histogramas correspondem a imagens densitométricas do COL1 normalizadas com a β -actina. Barras correspondem a valores médios \pm desvio padrão. UA-unidades arbitrárias. Painéis superiores ilustram bandas representativas obtidas no western blot.

Também não foram encontradas diferenças significativas na intensidade da banda α -SMA (banda num peso molecular de 42 kDa) entre os diferentes tipos de endométrios ($P > 0.05$), embora pela análise da Figura 7, a expressão desta proteína, característica da atividade dos miofibroblastos responsáveis pelo desenvolvimento de fibrose, tenda a ser mais elevada nos endométrios do tipo II e III, do que nos endométrios saudáveis.

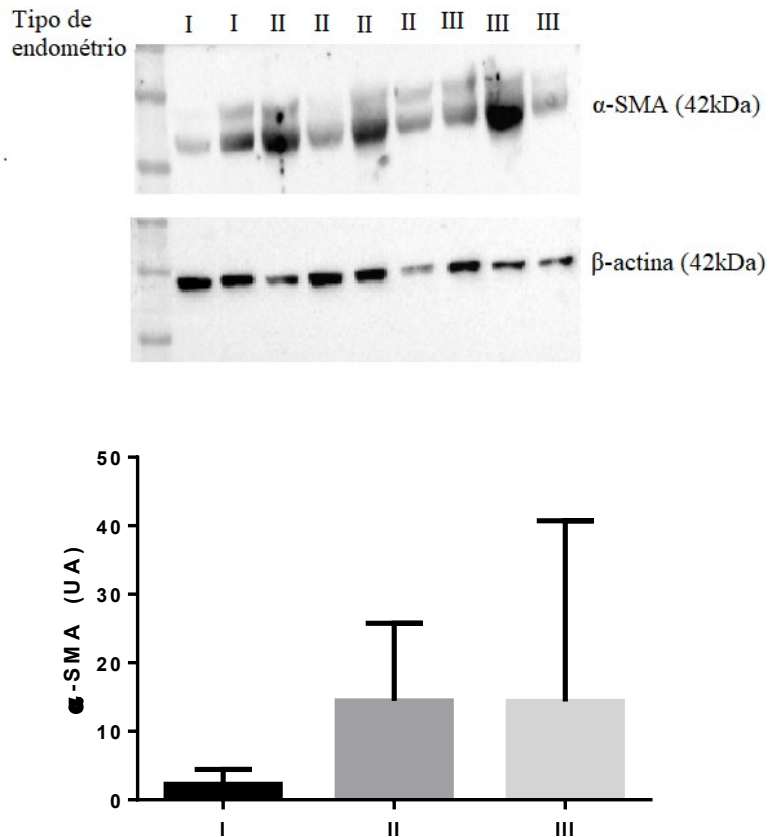


Figura 7. Expressão proteica da α -actina do músculo liso (α -SMA) em extratos proteicos de endométrios saudáveis (tipo I) e com diferentes graus de inflamação e fibrose (tipo II e III). Histogramas correspondem a imagens densitométricas de α -SMA normalizadas com a β -actina. Barras correspondem a valores médios \pm desvio padrão. UA-unidades arbitrárias. Painéis superiores ilustram bandas representativas obtidas no western blot.

A grande variabilidade (desvios padrão muito elevados) na expressão proteica da α -SMA registada nas amostras dos endométrios do tipo II e III da égua, pode estar relacionada com o facto de umas lesões poderem ser do tipo ativo (em que os miofibroblastos proliferam e predominam) e outras do tipo inativo (Hoffman *et al.*, 2009; Masseno, 2010).

III. Trabalho experimental 2 - Avaliação da qualidade do sémen de cavalo de raça Garrana, após preservação

1. Objectivos

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do sémen de cavalo de raça Garrana, após congelação por diferentes métodos. Pretendeu-se estudar o efeito de dois diluidores de congelação diferentes (Gent® e BotuCrio®), dois tempos de centrifugação (10 e 20 minutos) e da utilização de um meio de centrifugação do sémen (Centrifugation Cushion for Semen®).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Anatomo-fisiologia do aparelho reprodutor do garanhão

O aparelho reprodutor masculino compreende 2 testículos, localizados na região inguinal e envolvidos pelo escroto, um sistema de canais excretores (canais rectos, canais eferentes, epidídimo, canal deferente e a uretra), glândulas sexuais anexas (glândulas vesiculares ou vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais) e o pénis (Silva, 2009). Os testículos produzem os espermatozóides (células reprodutoras) e a testosterona (hormona sexual masculina). O escroto cobre os testículos e está envolvido na manutenção de uma temperatura mais baixa que a temperatura corporal, ideal à produção dos espermatozóides.

Cada testículo é formado por tubos seminíferos, rodeados por uma cápsula fibrosa, a albugínea, e pelas células de Leydig, que segregam a testosterona. Os espermatozóides passam para o epidídimo através dos ductos eferentes, neste sofrem um processo de maturação, indispensável para adquirem a capacidade de fecundarem o óvulo. Os ductos deferentes são tubos musculares que no momento de ejaculação, impulsionam os espermatozóides desde o epidídimo até à uretra prostática. As glândulas sexuais acessórias do macho são as ampolas dos ductos deferentes, vesículas seminais, próstata, e as glândulas bulbouretrais. Estas glândulas segregam uma grande parte do líquido seminal, ou sémen, indispensável como meio de transporte, nutrição e proteção dos espermatozóides contra o excesso de acidez do ducto genital feminino (Silva, 2009; Brinsko *et al.*, 2007).

O pénis é o órgão masculino da cópula, sendo composto maioritariamente por tecido erétil, e inclui a parte extrapélvica da uretra. Está apoiado pela fâscia do pénis e a pele, e a sua parte pré-escrotal está inserida numa bolsa cutânea, o prepúcio. Pode ser dividido em raiz, corpo e

glande. O pênis consiste essencialmente de dois corpos erécteis, o corpo cavernoso e o corpo esponjoso, constituídos principalmente por tecido elástico e muscular. A ereção peniana deve-se à penetração de maior quantidade de sangue pelos troncos arteriais, que leva ao aumento do tamanho e rigidez do órgão, e também à contração do musculo eretor do pênis (isquiocavernoso) (Silva, 2009).

2.2 O sémen equino

O sémen é constituído por espermatozóides e líquido seminal. A cor normal deve ser um branco-acinzentado-opalino (Mandal, 2019), o pH deve variar entre os 7.2 e 7.7 (McCue, 2014).

O plasma seminal é o conjunto de fluídos produzidos pelas vesículas seminais, próstata, testículos, epidídimo e pelas glândulas bulbouretrais e que é expelido na ejaculação com a função de transportar e fornecer substratos metabólicos para os espermatozóides, permitindo assim a maturação espermática (Brinsko *et al.*, 2007). O sémen contém ácido cítrico, aminoácidos, frutose, enzimas, fosforilcolina, prostaglandina, potássio e zinco (Mandal, 2019). Contudo a sua composição é variável entre os reprodutores, podendo ser benéfico ou nocivo à qualidade do sémen (Almeida, 2006). Assim é necessário removê-lo de modo a aumentar o tempo de viabilidade de sémen refrigerado (Brinsko *et al.*, 2000).

Os espermatozóides, são produzidos nos testículos e cada espermatozóide contém metade do código genético do cavalo. Quando este se une com um óvulo, que contém também metade dos cromossomas, o resultado é um zigoto contendo toda a informação hereditária. Os espermatozóides são constituídos por uma cabeça e um flagelo, o qual se divide em peça intermédia, peça principal e peça terminal. Na cabeça encontra-se o núcleo, com o material genético e o acrossoma. O movimento dos espermatozóides nas vias genitais masculinas são completamente passivos, pois a atividade própria só se manifesta após se misturar com as secreções das glândulas sexuais acessórias, no momento da ejaculação. A duração do tempo de fertilidade dos espermatozóides nas vias genitais femininas é de aproximadamente 72 horas (Silva, 2009).

2.3 Obtenção do sémen

O sémen pode ser colhido pela maioria dos garanhões no chão ou num tronco de salto, usando uma vagina artificial, após estimulação sexual. Certas situações como doença ou falta do tronco de salto requerem que a colheita seja feita com os garanhões no chão. Embora existam vários tipos de vaginas artificiais, as que têm melhores resultados tanto para a estimulação do cavalo como para melhor conservação do sémen ejaculado, são as aquecidas. A presença de uma fêmea em estro é o mais fácil para estimular o garanhão, alguns garanhões também apresentam ereção em resposta à égua independentemente da fase do seu ciclo éstrico em que se encontrem. Alguns garanhões também aprendem a responder sem a presença da égua, usando apenas a urina de uma égua em cio. O treino do cavalo para as colheitas é essencial para esta ser bem-sucedida (Forne e McDonnell, 1999).

2.4 Conservação do sémen

A criopreservação do sémen tem como objetivo manter a integridade e a viabilidade celular após submeter as células a baixas temperaturas (Cavalcante *et al.*, 2006). Na fertilidade do sémen congelado estão envolvidas diferentes etapas, tais como a colheita de sémen, a sua diluição, centrifugação, refrigeração, desidratação, congelamento e o descongelamento do sémen, que podem interferir com a integridade e viabilidade dos espermatozoides.

Os meios diluidores contêm vários componentes que atuam na manutenção da atividade metabólica dos espermatozoides, na estabilização do pH do meio, na proteção contra o choque térmico, na estabilidade do equilíbrio eletrolítico e osmótico, na inibição de proliferação bacteriana, no fornecimento de energia, entre outros (Furst, 2006; Lorenzoni, 2010).

Nos estudos com meios diluidores para refrigeração um fator de destaque é a incorporação de colesterol na membrana plasmática dos espermatozoides através do complexo de inclusão com ciclodextrina (White, 1993), obtendo-se melhor cinética espermática e integridade da membrana (Combes *et al.*, 2000).

Os meios diluidores comerciais são baseados em leite desnatado e gema de ovo, mas cada um tem componentes diferentes. O Spervital® só tem o glicerol como crioprotetor. O Equiplus® contém proteínas definidas e altamente purificadas produzidas em lotes padronizados e apresenta caseína retirada do leite, o que protege a membrana espermática e pode ou não ter

antibióticos que controlam a propagação de bactérias. Já o INRA96® contém caseína do leite, antibióticos e fungicida.

Nos meios de diluição para a congelação, o fator de destaque são os crioprotetores. Estes ligam-se às moléculas de água alterando o seu ponto de fusão, removendo os núcleos de cristalização não permitindo que se formem os cristais de gelo responsáveis pela crioinjúria. Os crioprotetores mais usados em equinos são o glicerol, o etilenoglicol, o dimetilsufóxido, a metilformamida e amidas (Squires *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2005).

Existem diversas técnicas para concentrar os espermatozóides do ejaculado (pellet) e por sua vez ser possível retirar o plasma seminal (sobrenadante). A técnica mais comumente usada é a centrifugação. No entanto, é necessário ter especial atenção à força e ao tempo de centrifugação, uma vez que estes têm alguns efeitos desfavoráveis na qualidade do sémen, tais como diminuir a taxa de mobilidade e provocar danos na morfologia de espermatozoides (Sieme *et al.*, 2003; Dell' Aqua *et al.*, 2001). Segundo Dell'aqua *et al.* (2001), o tempo e a força de centrifugação que apresenta melhores taxas de recuperação espermática é de 600 g durante 10 mi. O uso de uma força e um tempo maior que o devido pode levar a um compactamento muito grande do pellet o que leva a uma pior taxa de recuperação espermática. Meios à base de iodixanol (denominados de cushion), mais densos que os diluidores permitem o uso de forças de centrifugação mais elevadas sem haver o compactamento do pellet. O cushion, coloca-se no fundo do tubo que vai a centrifugar e funciona como uma almofada que reduz o dano mecânico aos espermatozóides (Ecot *et al.*, 2005; Knop *et al.*, 2005; Sieme *et al.*, 2005).

3. Materiais e métodos

Este estudo foi realizado no laboratório de Reprodução Animal Dr. França Martins, da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC).

3.1 Colheita e processamento do sémen

Foram obtidos quatro ejaculados de um garanhão da raça Garrana, com 10 anos de idade. A recolha foi efetuada pelo método de vagina artificial (modelo Hannover), sobre um manequim (tronco de salto), na presença de uma égua em cio imobilizada num tronco de contenção.

Após a colheita, o sémen foi filtrado num recipiente colocado em banho maria a 37° C, avaliado (quanto ao volume, cor, concentração, mobilidade, vitalidade e morfologia espermática) e diluído com um diluidor à base de leite (Spervital®- EVD+; ref.: 2 EVDP K5 101218UB1220) para centrifugação. A proporção de diluidor utilizada foi a necessária para obter uma concentração de 400×10^6 espermatozoides móveis/ml.

Após a diluição, o sémen foi transferido para 8 tubos cónicos de plástico de 15 ml. De modo a testar a influência do tempo de centrifugação e um meio de centrifugação para sémen (Centrifugation Cushion for Semen®; Ref. 022109, Inv technologies), 4 tubos foram centrifugados a 1700 g durante 10 min, em 2 dos quais foi introduzido 0,5 ml de cushion e outros 4 foram centrifugados a 1700 g durante 20 min, 2 dos quais com 0,5 ml de cushion.

Após centrifugação, a almofada de cushion foi removida com cuidado, de modo a não perturbar o sedimento, utilizando um cateter de perfusão endovenoso (G20 Ø1,0 x 32mm; 3,3cm comprimento; Ref.: 9009451, Henry Schein Inc., NY, USA). O sobrenadante foi retirado para tubos devidamente identificados. No sobrenadante procedeu-se à avaliação da mobilidade, concentração, vitalidade e morfologia espermática.

Aos sedimentos dos espermatozóides foram adicionados dois diluidores diferentes: um à base metilformamida e glicerol (BotuCrio® - BTC 025; Ref.: 025BTCYJ30) e outro à base de glicerol (Gent® - Minitube; Ref.: 13571/0100) diluído numa proporção de 1:1, com o diluidor de refrigeração (Spervital®). Os sedimentos de sémen centrifugados sem cushion, durante 10 minutos e os centrifugados durante 20 minutos, foram diluídos com 1ml de Gent + 1ml de Spervital ou com 2ml de Botucrio. Aos centrifugados durante 10 e 20 min com cushion, foram adicionados os mesmos diluidores. Desta forma, cada ejaculado foi submetido a oito tratamentos diferentes, de acordo com o esquematizado na Figura 8.

- ❖ Tubos de sémen, sem cushion, centrifugados durante 10 min, foi adicionado:
 - 1ml de Gent + 1ml de Spervital (GSC10)
 - 2ml de BotuCrio® (BSC10)
- ❖ Tubos de sémen, com cushion centrifugados durante 10 min, foi adicionado:
 - 1ml de Gent + 1ml de Spervital (GCC10)
 - 2ml de BotuCrio® (BCC10)
- ❖ Tubos de sémen, sem cushion, centrifugados durante 20 min, foi adicionado:
 - 1ml de Gent + 1ml de Spervital (GSC20)
 - 2ml de BotuCrio® (BSC20)
- ❖ Tubos de sémen, com cushion, centrifugados durante 20 min, foi adicionado:
 - 1ml de Gent + 1ml de Spervital (GCC20)
 - 2ml de BotuCrio® (BCC20)

Figura 8. Esquema dos oito tratamentos realizados em cada ejaculado.

Após diluição foi avaliada a mobilidade, concentração, vitalidade e morfologia.

O sémen foi posteriormente acondicionado em palhetas de 0,5mL (Ref.: 13408/3140, Minitube, Gmbt, Germany) as quais foram colocadas num tabuleiro de inox e arrefecidas a 4°C, durante 30 min. Para o congelamento, as palhetas foram submetidas a vapores de azoto líquido durante 10 min, utilizando para o efeito uma caixa de esferovite com uma camada de 5 cm de azoto líquido e posicionado o tabuleiro com as palhetas a uma altura de 5 cm do nível do azoto, sendo posteriormente mergulhadas diretamente no mesmo.

As palhetas de sémen foram armazenadas num contentor de azoto líquido, a -196°C, tendo sido descongeladas, em banho maria a 37°C, durante 1 minuto, para avaliação da mobilidade, concentração, vitalidade e morfologia espermática.

3.2 Avaliação do sémen

No sémen em natureza foi efetuado um espermograma sumário, tendo sido avaliado o aspeto, cor, volume, concentração, mobilidade, vitalidade e morfologia espermática.

Na análise quanto ao aspeto/cor, a cor pode variar de branco, branco leitoso, branco-pérola, branco-rosado.

O volume de ejaculado foi avaliado com uma proveta volumétrica graduada aquecida.

A concentração do sémen em fresco foi obtida por medição da absorvância de sémen (diluído a 1/40, numa solução de formaldeído) num fotolorímetro ($\lambda = 546 \text{ Nm}$) e confirmada por contagem manual dos espermatozóides na câmara de Neubauer.

A mobilidade foi avaliada num microscópio óptico, com platina aquecida a 37°C , após observação de 2 gotas de sémen colocadas entre lâmina e lamela. Foi feita uma avaliação dos espermatozóides com um movimento retilíneos.

A vitalidade foi avaliada num microscópio ótico, em esfregaços realizados com uma gota de sémen e uma gota de eosina-nigrosina. Foi efetuada a contagem dos espermatozóides vivos, que não ficam corados com a eosina mantendo-se incolores e dos mortos, que ficam corados com uma cor rosa.

Na avaliação morfológica dos espermatozoides foram utilizados os esfregaços de esoina-nigrosina, tendo-se efetuado num microscópio óptico, a contagem dos espermatozóides sem anomalias e daqueles com anomalias nas três partes do espermatozóide, cabeça, segmento intermédio e peça principal.

No sémen diluído antes da congelação, depois de descongelado e no sobrenadante, foi feita avaliação da vitalidade, mobilidade, morfologia e da concentração. Para calcular a concentração dos espermatozóides nestas frações foi efetuada a contagem manualmente dos mesmos na câmara de Neubauer.

3.3 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise estatística descritiva. Na análise dos dados foi ainda feita uma análise de Variância para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Foi utilizado o software GraphPadPrism 6.0 (Graph Pad Software Inc., USA). Foram considerados estatisticamente significativos valores com $P < 0,05$.

4. Resultados e discussão

Na tabela 1, estão representados os valores médios e respectivos desvios-padrões dos parâmetros seminais relativos às quatro colheitas de sémen em estudo, bem como os valores considerados normais em cavalos de médio porte (peso vivo 500-500kg) e usados como referência no Laboratório de Reprodução Animal, da ESAC.

A correta avaliação do volume de ejaculado associada à concentração espermática é um pré-requisito para o cálculo do número total de espermatozóides por ejaculado, sendo este último um fator determinante do número de doses para inseminação artificial que se conseguem obter (Axe *et al.*, 2000). Pela análise da tabela 1 podemos verificar que dos parâmetros estudados, apenas o volume de sémen ($25 \pm 7,07$ ml) se encontra fora dos valores considerados normais para esta espécie animal, tendo este variado entre 32 ml e os 18 ml. No entanto, os valores usados para comparar o volume de sémen, são valores referência para cavalos de médio porte (peso vivo 500-550kg). Sabe-se que cavalos com tamanho corporal menor, o tamanho dos testículos também é menor (Paccamonti *et al.*, 1999) e que o volume testicular está correlacionado com a produção de esperma (Pickett *et al.*, 1987). Sendo o sémen em estudo proveniente de um de cavalo de pequeno porte (raça Garrana: peso vivo 300-350kg), o volume de sémen ejaculado poder-se-á considerar normal para esta raça.

Tabela 1. Resultados da análise do sémen em natureza.

Parâmetro	Valores normais	Sémen em natureza
Volume (ml)	30 – 160	$25 \pm 7,07$
Vitalidade (%)	>60	$80,5 \pm 8,19$
Concentração (espermatozóides/ml)	100 - 200	$217,3 \pm 24,32$
Mobilidade (%)	>60	$73,75 \pm 11,09$
Espermatozóides sem anomalias (%)	80	$93,25 \pm 1,26$
Espermatozóides com anomalias (%)	20	$6,75 \pm 1,26$
Espermatozóides com anomalias na Cabeça (%)	4	$2,25 \pm 0,5$
Espermatozóides com anomalias na Peça Intermédia (%)	3	$2,25 \pm 0,5$
Espermatozóides com anomalias na Peça Principal (%)	13	$2,25 \pm 0,96$

Valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão. Valores normais usados como referência no Laboratório de Reprodução Animal, da ESAC.

A percentagem de espermatozóides vivos foi avaliada nos diferentes tratamentos e em momentos separados, ou seja, foram avaliados no sémen diluído depois de centrifugado e antes do congelamento (SD), depois de descongelar (SC) e no sobrenadante (SN). O valor médio e desvio padrão da vitalidade dos espermatozóides nas três frações de sémen resultantes dos oito tratamentos efetuados, estão representados na tabela 2.

Não se registaram diferenças entre tratamentos na vitalidade dos espermatozóides em cada fração de sémen estudada. No entanto, comparando os resultados obtidos no sémen diluído antes do congelamento (SD) e depois de descongelado (SC) podemos verificar uma percentagem de espermatozóides vivos significativamente maior na primeira fração ($P < 0.01$) em todos os tratamentos estudados.

Embora não significativa, a centrifugação do sémen durante 20 min parece ter um efeito deletério na vitalidade após descongelação, uma vez que com a % de espermatozoides vivos pós descongelação (SC) foi maior no sémen centrifugado durante 10min, independentemente do tipo de diluidor utilizado, exceto quando o cushion foi adicionado ao Botucrio, onde esta almofada parece ter tido um efeito protetor dos espermatozóides. Nos tratamentos com Gent sem cushion a vitalidade foi maior do que com o uso de cushion.

No sobrenadante resultante da centrifugação do sémen, apesar os diluidores usados, Gent ou Botucrio, não terem tido qualquer influência, parece haver uma tendência para que com o Gent, a centrifugação durante 10 minutos ser mais favorável à sobrevivência dos SPZ. Também no sobrenadante parece haver uma tendência para o cushion ter tido um efeito protetor dos espermatozoides, uma vez que a % de espermatozóides vivos é sempre mais elevada nos grupos GCC10, GCC20, BCC10 e BCC20.

Tabela 2. Vitalidade (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), nos diferentes tratamentos estudados.

Tratamento	SD	SC	SN
GSC10	79±11,28 ^a	44,25±8,34 ^a	81,5±1,92
GSC20	80,25±10,37 ^b	35,25±18,89 ^b	62,25±12,45
GCC10	82,75±8,73 ^b	38,25±19,57 ^b	82,5±7,14
GCC20	82,25±12,04 ^b	34,75±17,35 ^b	80,5±7,55
BSC 10	74,25±7,63 ^b	34±13,56 ^b	74,25±6,75
BSC20	80±17,45 ^b	25,25±11,9 ^b	74±7,35
BCC10	75,5±9,747 ^b	24,5±8,54 ^b	81,75±11,15
BCC20	83,5±3,69 ^b	42,5±23,69 ^b	79,25±8,22

GSC 10- Gent, sem cushion, 10 min de centrifugação; GSC 20- Gent, sem cushion, 20 min de centrifugação; GCC 10- Gent, com cushion, 10 min de centrifugação; GCC 20- Gent, com cushion, 20 min de centrifugação; BSC 10- Botucrio, sem cushion, 10 min de centrifugação; BSC 20- Botucrio, sem cushion, 20 min de centrifugação; BCC 10- Botucrio, com cushion, 10 min de centrifugação; BCC 20- Botucrio, com cushion, 20 min de centrifugação. Valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha indicam diferenças significativas entre as frações do sémen estudadas ($a=P < 0,01$; $b=P < 0,00=1$).

A concentração dos espermatozoides foi avaliada no sémen diluído depois de centrifugado e antes do congelamento (SD), depois de descongelar (SC) e no sobrenadante (SN). Os valores médios e respectivos desvios padrão obtidos estão representados na tabela 3.

No sémen antes do congelamento (SD) não houve diferenças significativas entre os tratamentos, embora pareça existir uma tendência para uma diminuição do número de SPZ/ml quando o cushion é utilizado. No entanto, quando o sémen é centrifugado durante mais tempo (20 min), o uso de cushion (GCC20 e BCC20) parece aumentar a concentração espermática.

Analisando o sémen depois de descongelado (SC) a concentração entre tratamentos foi muito diferente entre elas. Verificou-se a existência de diferenças significativas entre os seguintes tratamentos: GSC10 e GCC10 ($P < 0,05$), GSC20 e BCC10 ($P < 0,05$), GCC20 e BSC10 ($P < 0,05$), BSC20 e BCC10 ($P < 0,05$), nos tratamentos GSC10 e BCC10 ($P < 0,01$), GCC10 e BSC10 ($P < 0,01$), BSC10 e BCC10 ($P < 0,01$). De uma forma geral a utilização de cushion no sémen centrifugado durante 10 minutos parece estar relacionada com concentrações de espermatozoides mais baixas.

No sobrenadante (SN) embora não tenha existido diferenças significativa entre tratamentos, parece haver uma tendência para uma maior concentração de espermatozóides no sobrenadante quando se utiliza o cushion, independentemente do tempo de centrifugação. Não se verificou qualquer efeito do tempo de centrifugação sobre este parâmetro.

Tabela 3. Concentração (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), nos diferentes tratamentos estudados.

Tratamento	SD	SC	SN
GSC10	320,5±199,5	414,5±144,8 ^{a,b}	38,5±13,89
GSC20	305,3±107,4	391,5±106,4 ^c	41,5±25,79
GCC10	233,5±82,53	270±80 ^{a,d}	57,75±16,38
GCC20	252±112,2	310±100 ^e	60±17,2
BSC 10	302,8±166,8	442,5±144,5 ^{d,e,f}	39,25±17,88
BSC20	274±75,49	388,5±88,37 ^B	39,25±17,42
BCC10	202,8±69,16	256,5±73 ^{b,c,f,g}	60,5±33,88
BCC20	284,5±116,1	351,8±165,8	56,75±24,38

GSC 10- Gent, sem cushion, 10 min de centrifugação; GSC 20- Gent, sem cushion, 20 min de centrifugação; GCC 10- Gent, com cushion, 10 min de centrifugação; GCC 20- Gent, com cushion, 20 min de centrifugação; BSC 10- Botucrio, sem cushion, 10 min de centrifugação; BSC 20- Botucrio, sem cushion, 20 min de centrifugação; BCC 10- Botucrio, com cushion, 10 min de centrifugação; BCC 20- Botucrio, com cushion, 20 min de centrifugação. Valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão. Letras iguais correspondem a diferenças significativas entre tratamentos (a, c, e, g- $P < 0,05$; b, d, f- $P < 0,01$).

A mobilidade progressiva dos espermatozóides foi igualmente avaliada no sémen diluído depois de centrifugado e antes do congelamento (SD), depois de descongelar (SC) e no sobrenadante (SN). Os dados da média e desvio padrão obtidos estão representados na tabela 4.

Neste parâmetro não se observou nenhum efeito significativo do tempo de centrifugação, diluidor de diluidor de congelação e no uso de cushion nas diferentes frações de sémen estudadas ($P > 0,05$).

No sémen diluído depois de centrifugado e antes do congelamento (SD), existe uma tendência para nos tratamentos com 10 minutos de centrifugação existirem melhores resultados do que

os de 20 minutos, sendo a associação de 10 minutos de centrifugação com cushion o procedimento que resultou numa maior taxa de mobilidade dos SPZ. Quando o sémén é centrifugado durante 20 minutos, parece existir uma tendência para a utilização de cushion ter um efeito benéfico na mobilidade dos espermatozoides ($P=0,085$), apresentando os grupos GCC 20 ($78,75\pm 6,29\%$) e BCC 20 ($77,5\pm 8,66\%$) uma % de SPZ móveis superior aos GSC 20 ($55\pm 29,72\%$) e BSC 20 ($61,25\pm 23,23\%$).

No sémén descongelado (SC), embora não sem significância estatística, os tratamentos em que o Gent foi utilizado como diluidor, a centrifugação a 10 minutos apresenta resultados de mobilidade mais elevados do que a de 20 minutos, não se verificando nenhuma ação benéfica do cushion.

Tabela 4. Mobilidade (%) do sémén diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), nos diferentes tratamentos estudados.

Tratamento	SD	SC	SN
GSC10	71,25±27,8	23,75±7,5	68,75±8,54
GSC20	55±29,72	16,25±16,01	67,5±5
GCC10	81,25±8,54	22,5±10,41	71,25±8,54
GCC20	78,75±6,29	18±10,92	63,75±12,5
BSC 10	73,75±11,09	23,75±11,09	63,75±11,09
BSC20	61,25±23,23	23,75±11,09	62,5±17,08
BCC10	83,75±4,79	18,75±6,29	61,25±6,29
BCC20	77,5±8,66	22,75±18,08	58,75±17,5

GSC 10- Gent, sem cushion, 10 min de centrifugação; GSC 20- Gent, sem cushion, 20 min de centrifugação; GCC 10- Gent, com cushion, 10 min de centrifugação; GCC 20- Gent, com cushion, 20 min de centrifugação; BSC 10- Botucio, sem cushion, 10 min de centrifugação; BSC 20- Botucio, sem cushion, 20 min de centrifugação; BCC 10- Botucio, com cushion, 10 min de centrifugação; BCC 20- Botucio, com cushion, 20 min de centrifugação. Valores apresentados são média ± desvio padrão.

O total de espermatozoides sem anomalias morfológicas foi avaliado no sémén diluído depois de centrifugado e antes do congelamento (SD), depois de descongelar (SC) e no sobrenadante (SN). Os dados da média e desvio padrão obtidos estão representados na tabela 5.

No sémén diluído depois de centrifugado e antes do congelamento (SD) e no sémén descongelado (SC), não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P >$

0,05). No entanto, no sobrenadante (SN), a maior percentagem de espermatozoides morfológicamente normais foi registada no tratamento BSC 10, tendo esta sido significativamente diferente dos tratamentos GSC 10 ($P < 0,05$), GCC 10 ($P < 0,01$) e BCC 10 ($P < 0,01$), sem que isto se tenha traduzido numa diminuição dos SPZ sem anomalias no sedimento

Tabela 5. Total de espermatozoides sem anomalias morfológicas (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), dos diferentes tratamentos estudados.

Tratamento	SD	SC	SN
GSC10	93,75±1,26	94±0,82	93,75±0,5 ^a
GSC20	94,25±2,22	93,75±1,5	94,5±1,30
GCC10	94,25±1,26	93,75±0,5	94,25±0,50 ^b
GCC20	94±0,82	93±1,41	93,5±1,29
BSC10	94,25±1,26	93,5±1,29	95,5±0,58 ^{a, b, c}
BSC20	94±1,41	93,5±10	95,00±0,82
BCC10	93,75±0,96	93,75±1,89	93,5±0,58 ^c
BCC20	93,75±0,96	94,25±0,50	94,75±0,50

GSC 10- Gent, sem cushion, 10 min de centrifugação; GSC 20- Gent, sem cushion, 20 min de centrifugação; GCC 10- Gent, com cushion, 10 min de centrifugação; GCC 20- Gent, com cushion, 20 min de centrifugação; BSC 10- Botucrio, sem cushion, 10 min de centrifugação; BSC 20- Botucrio, sem cushion, 20 min de centrifugação; BCC 10- Botucrio, com cushion, 10 min de centrifugação; BCC 20- Botucrio, com cushion, 20 min de centrifugação. Valores apresentados são média ± desvio padrão. Letras iguais correspondem a diferenças significativas (a, c- $P < 0,01$; b- $P < 0,05$).

O total de espermatozoides com anomalias morfológicas foi igualmente avaliado nas três frações de sémen em estudo, cujos valores médios e desvios padrão são apresentados na tabela 6. Tal como o verificado no parâmetro anterior, só se registaram diferenças significativas entre tratamentos no sobrenadante. Nesta fração, foi no tratamento BSC10 que se verificou uma menor percentagem de espermatozoides com anomalias morfológicas (4,5±0,58%), a qual foi significativamente diferente da dos tratamentos GSC10 (6,25±0,5; $P < 0,05$), GCC20 (6,5±1,29; $P < 0,01$) e BCC10 (6,5±0,58; $P < 0,01$), mas sem que isso se tenha repercutido num aumento do nº de SPZ com anomalias no sedimento.

Tabela 6. Total de espermatozoides com anomalias (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), dos diferentes tratamentos estudados.

Tratamento	SD	SC	SN
GSC10	6,25±1,26	6±0,82	6,25±0,5 ^a
GSC20	5,75±2,22	6,25±1,5	5,5±1,29
GCC10	5,75±1,26	6,25±0,5	5,75±0,5
GCC20	6±0,82	7±1,41	6,5±1,29 ^b
BSC 10	5,75±1,26	6,5±1,29	4,5±0,58 ^{a,b,c}
BSC20	6±1,41	6,5±1	5±0,82
BCC10	6,25±0,96	6,25±1,89	6,5±0,58 ^c
BCC20	6,25±0,96	5,75±0,5	5,25±0,5

GSC 10- Gent, sem cushion, 10 min de centrifugação; GSC 20- Gent, sem cushion, 20 min de centrifugação; GCC 10- Gent, com cushion, 10 min de centrifugação; GCC 20- Gent, com cushion, 20 min de centrifugação; BSC 10- Botucrio, sem cushion, 10 min de centrifugação; BSC 20- Botucrio, sem cushion, 20 min de centrifugação; BCC 10- Botucrio, com cushion, 10 min de centrifugação; BCC 20- Botucrio, com cushion, 20 min de centrifugação. Valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão. Letras iguais correspondem a diferenças significativas (a- $P<0,05$; b, c- $P<0,01$).

Foi igualmente objeto de estudo a localização da sede das anomalias morfológicas dos espermatozóides no sémen diluído depois de centrifugado e antes do congelamento (SD), depois de descongelar (SC) e no sobrenadante (SN). Os dados dos valores médios e respetivos desvios padrão das anomalias ao nível da cabeça, da peça intermédia e da peça principal estão representados na tabela 7. Podemos verificar a inexistência de qualquer efeito significativo dos diluidores de congelação (Gent® e BotuCrio®), dos tempos de centrifugação (10 e 20 minutos) e do uso de cushion em todas as frações de sémen em estudo.

Tabela 7. Espermatozoides com anomalias na cabeça (%), na peça intermédia (PI) (%) e na peça principal (PP) (%) do sémen diluído antes do congelamento (SD), pós-congelamento (SC) e do sobrenadante (SN), dos diferentes tratamentos estudados.

Tratamento	SD			SC			SN		
	Cabeça	PI	PP	Cabeça	PI	PP	Cabeça	PI	PP
GSC10	2±0,82	2±0	2,25±0,5	1,75±0,5	2±0	2,25±0,5	2±0	2,25±0,5	2±0
GSC20	1,5±1,25	2±1,16	2,25±0,9	1,75±1,26	2,25±0,5	2,25±0,5	2±1,16	1,25±0,9	2,25±0,5
GCC10	1,5±0,58	2,25±0,5	2±0,82	2,25±0,5	2±0	2±0	2,5±1	1,5±0,58	1,75±0,5
GCC20	1,5±1,25	2±0,82	2,5±0,58	2,25±0,5	2±0,82	2,75±0,9	2,75±1,5	1,75±0,5	2±0
BSC10	2±0	1,5±1	2,25±0,5	1,75±0,5	2±0	2,75±0,9	1,25±0,5	1,25±0,9	2±0
BSC20	1,75±1,2	1,75±0,5	2,5±0,58	2,25±0,5	2±0	2,25±0,5	1,5±1	2±0	1,5±0,58
BCC10	1,75±1,2	2±0	2,5±0,58	2±0,82	2±1,16	2±1,41	2±0	2,25±0,5	2,25±0,5
BCC20	2±1,63	2±0,82	2,25±0,9	2,25±0,5	2±0	2±0	1,75±0,9	1,5±0,58	2±0

GSC 10- Gent, sem cushion, 10 min de centrifugação; GSC 20- Gent, sem cushion, 20 min de centrifugação; GCC 10- Gent, com cushion, 10 min de centrifugação; GCC 20- Gent, com cushion, 20 min de centrifugação; BSC 10- Botucrio, sem cushion, 10 min de centrifugação; BSC 20- Botucrio, sem cushion, 20 min de centrifugação; BCC 10- Botucrio, com cushion, 10 min de centrifugação; BCC 20- Botucrio, com cushion, 20 min de centrifugação. PI- peça intermédia; PP- Peça principal. Valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão.

IV. Conclusão

Nos estudos imunohistoquímicos não nos foi possível detectar a presença do CD147 e as marcações que nos pareciam demonstrar a presença de decorina, demonstraram-se inespecíficas quando usámos a IgG. Como não obtivemos marcações usando este método não nos é possível tirar ilações relativamente à sua presença no endométrio das éguas e ao seu envolvimento na formação de endometrose.

Através do método de western blot não obtivemos marcações específicas da decorina. Podemos notar um aumento da expressão de Col 1 e de α -SMA com o maior grau de lesões do endométrio, o que nos leva a concluir que a presença destas proteínas está relacionada com o desenvolvimento desta doença.

No estudo do processamento para criopreservação de sémen de Garrano podemos concluir que a centrifugação durante 10 minutos e o uso de cushion resulta em melhores taxas de mobilidade e vitalidade.

Tal como era espectável, a criopreservação dos espermatozóides traduziu-se numa menor percentagem de SPZ vivos, independentemente do processamento utilizado. De uma forma geral a utilização de cushion no sémen centrifugado durante 10 minutos parece estar relacionada com concentrações espermáticas mais baixas no sémen depois de descongelado. Embora no sémen centrifugado durante 10 min, sem cushion, e diluído com Botucurio, origine um maior número de células morfológicamente normais e um menor número de células com anomalias no sobrenadante, isto não teve repercussão sobre do número de células morfológicamente normais ou com anomalias no sedimento de espermatozóides que irá posteriormente ser usado na preparação de doses para inseminação artificial.

Embora sejam necessários realizar mais ensaios, com um maior número de indivíduos de raça Garrana e com um maior número de ejaculados, os resultados obtidos neste estudo, apesar de não terem existido diferenças significativas, parecem indicar-nos o seguinte:

- i. No sémen antes de congelar a centrifugação durante 10 minutos, parece originar melhores taxa de mobilidade;
- ii. No sémen antes de congelar parece existir uma tendência para uma diminuição do número de espermatozoides/ml quando o cushion é utilizado;

- iii. A centrifugação do sémen durante 20 min parece ter um efeito nocivo sobre a vitalidade dos espermatozoides após descongelação, independentemente do tipo de diluidor utilizado;
- iv. Nos tratamentos com Gent, a centrifugação durante 10 minutos, parece originar uma percentagem de espermatozoides vivos e móveis mais elevados no sémen após descongelação, sem cushion a vitalidade foi maior do que com o uso de cushion;
- v. a associação de cushion, centrifugação durante 20 min e Botucurio, parece ter um efeito protetor da vitalidade dos espermatozóides após a descongelação;
- vi. A utilização de cushion parece ter um efeito benéfico sobre a mobilidade dos espermatozóides em ambos os tempos de centrifugação estudados.

V. Bibliografia

Almeida, J. L. (2006) - *Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sémen equin*. 16 p. Dissertação – Mestrado em ciências agrárias - Faculdade de agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

Alvarenga, M. A.; Papa, F. O.; Buratini, Jr. J. (1996) - *The effect of breeds spermatic parameters over equine sémen freezability*. In: Symposium on Stallion sémen. Amersfoot, p. 82.

Alves, V. A. F., Bacchi, C. E.; Vassallo, J. (1999) - *Manual de Imuno-histoquímica*, São-Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia.

Aroeira, L. S.; Aguilera, A.; Sanchez-Tomero, J. A.; Bajo, M. A.; Peso, G.; Jimenez-Hefferman, J. A.; et al. (2007) - *Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potencial therapeutic interventions*. Journal of the American Society of Nephrology, vol. 18, p. 2004-2013.

Aguilar, J.; Hanks, M.; Shaw, D. J.; Else, R.; Watson, E. (2006) - *Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares*. Theriogenology, vol.66, p. 423-430.

Amaral, D. (2002) - *Estudo morfológico e histoquímico do endométrio de éguas PSI*. Tese de doutorado, Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Axe R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Belin, M.E. (2000). *Semen evaluation*. In: Hafez, E.S.E. and Hafez, B.(ed.). Reproduction in farm animals. USA: Lippinco TT Williams and Wilkins.

Becker, R. L. Jr. (1993) - *Standartization and quality controlo f quantitative microscopy in pathology*. Journal Cellular Biochemistry, vol. 17, p. 199-204.

Bertoni, T. A.; Perenha-Viana, M. C.; Patussi, E. V.; Cardoso, R. F.; Svidzinski, T. I. (2012) - *Western blotting is an eficiente tool for differential diagnosis of paracoccidioidomycosis and pulmonar tuberculosis*. Clinical and Vaccine Immunology: CVI, vol. 19, p. 1887-1888.

Biswas, C.; Zhang, Y.; DeCastro, R.; Guo, H.; Nakamura, T.; Kataoka, H.; Nabeshima, K. (1995) - *The human tumor cell-derived collagenase stimulatory facto (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily*. Cancer Res., vol. 55, p. 434-439.

Bodey B. (1997) - *The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms*. Expert Opin Biology Ther., vol. 2, p.371-393.

Border, W. A.; Noble, N. A.; Yamamoto, T.; et al. (1992) - *Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease*. Nature, vol. 360, no.6402, p.361-364.

Border, W. A.; Ruoslahti, E. (1992) - *Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repairs*. The Journal of Clinical Investigation, vol. 90, no.1, p.1-7.

Bourke, M.; Mills, J. N.; Barnes, A. L. (1997) - *Collection of endometrial cells in the mare*. Australian Veterinary Journal, vol. 75, p.75-755.

- Brinsko, S. P.; Crockett, E. C.; Squires, E. L. (2000) - *Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage*. Theriogenology, vol. 129-136, p. 54.
- Brinsko, S. P.; Love, C. C.; Bauer, J. E.; Macpherson, M. L.; Varner, D. D. (2007) - *Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions with unexplained subfertility*. Animal Reproduction Science. Elsevier, vol. 99, p. 65-71.
- Brandan, E.; Cabello-Verrugio, C.; Vial, C. (2008) - *Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy*. Matrix Biology, vol. 27, p. 700-708.
- Brandtzaeg, P. (1998) - *The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry*. Journal Immunology Methods, vol. 216, p.49-67.
- Braundmeier, A. G; Fazleabas, A. T.; Lessey, B. A.; Guo, H.; Toole, B. P.; Nowak, R. A. (2006) - *Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates metalloproteinases in human uterine endometrium*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 91, p.2358-2365.
- Braundmeier, A. G.; Nowak, R. A. (2006) - *Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer*. American Journal of Reproductive Immunology, vol. 56, p.201-214.
- Brezillon, S.; Pietraszki, K.; Maquart, F. X.; Wegrowski, Y. (2013) - *Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins*. FEBS Journal, vol. 280, p.2369-2381.
- Canelle, L.; Bousquet, J.; Pionneau, C; et al. (2005) - *An efficient proteomics based approach for the screening of autoantibodies*. Journal of Immunological methods, vol.299, p. 77-89.
- Castaño, Z.; Kypta, R. M. (2008) - *Housekeeping Proteins: Limitations as references during neuronal differentiation*. The Open Neuroscience Journal, vol. 2, p.36-40.
- Carrino, D.; Mesiano, S.; Barker, N.; Hurd, W. W.; Caplan, A. I. (2012) - *Proteoglycans of uterine fibroids and keloid scars: similarity in their proteoglycan composition*. Biochemistry Journal, vol. 443, p. 361-368.
- Cavalcante, Marcelo Borges, Duarte, Ana Beatriz Graça, Araújo, Danielle Oliveira de, Teles, Eugênio Pacelli de Barreto. (2006). *Criopreservação de sêmen humano: comparação entre métodos de congelação e tipos de envase*. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, vol. 28, p. 708-714.
- Chambers, R. C. (2008) - *Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention?* British Journal of Pharmacology, Londres, vol.153, p.367-378.
- Chen, H.; Fok, K. L.; Yu, S.; Jiang, J.; Chen, Z.; Gui, Y.; et al. (2011) - *CD147 is required for matrix metalloproteinases-2 production and germ cell migration during spermatogenesis*. Molecular Human Reproduction, vol. 17, p.405-414.

- Chen, H.; Fok, K. L.; Jiang, X.; Chan, H. C. (2012) - *New insights into germ cell migration and survival/apoptosis in spermatogenesis: lessons from CD 147*. *Spermatogenesis*, vol. 2, p. 264-272.
- Combes, G. B.; Varner, D. D.; Schroeder, F.; Burghardt, R. C.; Blanchard, T. L. (2000) - *Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing*. *J Reprod. Fert. Suppl.*, vol. 56, p. 127-132.
- Dascanio, J. J.; et al. (1998) - *Magnesium sulfate intrauterine therapy in the mare*. *Equine pract.*, vol.20, p. 10-13.
- Dascanio, J.J.; Ley, W. B.; Bowen, J. M. (1997) - *How to perform and interpret uterine cytology*. *AAEP Proc.*, vol. 43, p. 182-186.
- Dell'aqua, J. A.; Papa, F. O.; Alvarenga, M. A.; Zahn, F. S. (2001) - *Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen*. *Animal Reproduction Science*, vol. 68, p. 324-325.
- Dittmer, A.; Dittmer, J. (2006) - *Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis*. *Electrophoresis*, vol. 27, p. 2844-2845.
- Droguett, R.; Cabello-Verrugio, C.; Riquelme, C.; Brandan, E. (2006) - *Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation*. *Matrix Biology*, vol. 28, p. 332-341.
- Eaton, S.L.; Roche, S.L; Hurtado, M.; et al. (2013) - *Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent western blotting*. *PloS One*, vol. 8.
- Ecot, P.; Decuadro-Hansen, G.; Delhomme, G.; Vidament, M. (2005) - *Evaluation of cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing*. *Animal Reproduction Science*, vol. 89, p. 245-248.
- Eleferiou, F.; Exposito, J. Y.; Garrone, R.; Lethias, C. (2001) - *Binding of tenascin to decorin*. *FEBS Lett*, vol. 495, p. 44-47.
- Elias, J. M. (1990) - *Immunohistopathology: a practical approach to diagnosis*. Chicago: ASCP Press.
- Evans, T. J.; Miller, M. A.; Ganjam, V. K.; Niswender, K. D.; Eilersieck, M. R.; Krause, W. J.; Youngquist, R. S. (1998) - *Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares*. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 59, no.10, p. 1209-1214.
- Farmer, S. R.; Wan, K. M.; Bem-Zeev, A.; Penman, S. (1983) - *Regulation of actin mRNA levels and translation responds to changes in cell configuration*. *Mol. Cell Biol.*, vol. 3, p. 182-189.
- Feugaing, D. D. S.; Götte, M.; Viola, M. (2013) - *More than matrix: the multifaceted role of decorin in cancer*. *European Journal of Cell Biology*, vol. 93 no.1, p. 1-11.
- Fiorenza, M. F. (2017) - *Perfil transcricional do endométrio de fêmeas equinas com diferentes graus de fibrose*. Tese Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre.
- Forney, B.; McDonnell, S. M. (1999) - *How to Collect Semen from Stallions While They Are Standing on the Ground*. *AAEP Proceedings*, vol. 45, p. 142-145.

- Fok, K. L.; Chen, H.; Ruan, Y. C.; Chan, H. C. (2014) - *Novel regulators of spermatogenesis*. Semin. Cell Devol. Biol., vol. 29, p. 31-42.
- Fürst, R. (2006) - *Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sémen equino*. Tese doutoramento, Universidade Federal de Viçosa.
- Gassmann, M.; Grenacher, B.; Rohde, B.; Vogel, J. (2009) - *Quantifying western blots: pitfalls of densitometry*. Electrophoresis, vol. 30, p. 1845-1855.
- Gilda, J. E.; Gomes, A. V. (2013) - *Stain-Free total protein staining is a superior loading control for beta-actin for western blots*. Analytical biochemistry, vol. 440, p. 186-188.
- Giri, S. N.; Hyde, D. M.; Braun, R. K.; Gaarde, W.; Harper, J. R.; Pierschbacher, M. D. (1997) - *Antifibrotic effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis*. Biochemistry Pharmacology, vol. 276, p. 1205-1216.
- Gomes, A. V.; Young, G.W.; Wang, Y.; et al. (2009) - *Contrasting proteome biology and funcional heterogeneity of the 20 S proteasome complexes in mammalian tissues*. Molecular & celular proteomics: MCP, vol. 8, p. 302-315.
- Gomes, A. V.; Zong, C. Edmondson, R. D.; et al. (2006) - *Mapping the murine cardiac 26 S proteasome complexes*. Circulation Research, vol. 99, p. 362-371.
- Haines, D. M.; West, K. H. (2005) - *Immunohistochemistry: forging the link between immunology and pathology*. Veterinary Immunology Immunopathology, vol. 108, p. 151-156.
- Handler-Olsen, E.; Winberg, J. O.; Uhlin-Hansen, L. (2013) - *Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets*. Tumour Biology, vol. 34, p.2041-2051.
- Hinz, B. (2007) - *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. Journal Investigation Dermatology, vol. 127, no. 3, p. 526-537.
- Hinz, B.; Phan, S. H.; Thannickal, VOL.J.; Galli, A.; Piallat, M. L. B.; Gabbiani, G. (2007) - *The myofibroblast: One function, multiple origins*. American Journal of Pathology, vol. 170, p. 1807-1216.
- Hoffman, C.; Ellenberger, C.; Mattos, R. C.; Aupperle, H.; Dhein, S.; Stief, B.; Schoon, H. A. (2009) - *The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis*. Animal Reproduction Science, vol. 111, p. 261-278.
- Hoffman, C.; Bazer, F. W.; Klug, J.; Aupperle, H.; Ellenberger, C.; Schoon, H. A. (2009) - *Immunohistochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium – Expression patterns for mares suffering from endometrosis*. Theriogenology, vol. 71, p. 264-274.
- Hua, H.; Li, M.; Luo, T.; Yin, Y.; Jiang, Y. (2007) - *Matrix metalloproteinases in tumorigenesis an evolving paradigm*. Cellular and Molecular Life Sciences, v.68, p.3853-3868, 2011.
- Huang, S. M.; Minassian, H.; More, J. D. (1976) - *Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion*. Lab Invest, vol. 35, p. 383-390.

- Hsi, E. D. (2001) - *A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory*. Arch Pathol Lab Med, vol. 125, p. 289-294.
- Hsu, S. M.; Raine, L. (1981) - *Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry*. Journal Histochemistry Cytochemistry, vol. 29, p. 1349-1353.
- Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H. (1981) - *A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies*. American Journal of Clinical Pathology, vol. 75, p. 734-738.
- Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H. (1981) - *The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase technics*. American Journal of Clinical Pathology, vol. 75, p. 816-821.
- Iozzo, R. V. (1999) - *The Biology of the Small Leucine-rich Proteoglycans, Functional Network of Interactive Proteins*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 18843-18846.
- Iacono, K. T.; Brown, A. L.; Greene, M. L.; Saouaf, S. J. (2007) - *CD 147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology*. Experimental and Molecular Pathology, vol. 83, p. 283-295.
- Jaffer, S.; Bleiweiss, I. J. (2004) - *Beyond hematoxylin and eosin-The role of immunohistochemistry in surgical pathology*. Cancer Investigation, vol. 22, p. 445-465.
- Järvinen, T. A. H.; Ruoslahti, E. (2010) - *Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, no. 50, p. 21671-21676.
- Järvinen, T. A. H.; Ruoslahti, E. (2013) - *Targeted antiscarring therapy for tissue injuries*. Advanced in Wound Care, vol. 2, no. 2, p. 50-54.
- Kasinrerk, W.; Fiebiger, E.; Stefanova, I.; Baumruker, T.; Knapp, W.; Stockinger, H. (1992) - *Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin and chicken HT7 molecule*. Journal Immunology, vol. 149, p. 847-854.
- Kenney, R. M. (1978) - *Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on equine early embryonic death*. Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, vol. 172, p. 241-262.
- Kenney, R. M. (1992) - *The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis*. Equine Veterinary Journal, Newmarket, vol. 125, p. 186.
- Kenney, R. M.; Doig, P. A. (1986) - *Equine endometrial biopsy*. In: Morrow, D.A., Ed., Current Therapy in Theriogenology, WBSaunders, Philadelphia, p.723-729.
- Knop, K.; Hoffmann, N.; Rath, D.; Sieme, H. (2005) - *Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability*. Animal Reproduction Science, vol. 89, p. 294-297.
- Kresse, H.; Schonherr, E. (2001) - *Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control*. The Journal of Cellular Physiology, vol. 189, p. 266-274.

- Krusius, T. and Ruoslahti, E. (1986) - *Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, vol. 83, p. 7683-7687.
- Kuno, N.; Kadomatsu, K.; Fan, Q. W.; Hagihara, M.; Senda, T.; Mizutani, S.; et al. (1998) - *Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily*. FEBS Lett, vol. 425, p. 191-194.
- Kurien, B. T.; Scofield, R. H. (2006) - *Western blotting*. Methods, vol. 38, p. 283-293.
- Lee, C. L.; Lam, M. P.; Lam, K. K.; Leung, C. O.; Pang, R. T.; Chu, I.K.; Wan, T. H.; Chai, J.; Yeung, W. S.; Chiu, P. C.; et al. (2013) - *Identification of CD147 (basigin) as a mediator of trophoblast functions*. Hum. Reprod. vol. 28, p. 2920-2929.
- Lemoine, S.; Cadoret, A.; El Mourabit, H.; Thabut, D.; Housset, C. (2013) - *Origins and functions of liver myofibroblasts*. Biochimica et Biophysica Acta Mol Basis Dis, vol. 1832, no. 7, p. 948-954.
- Leong, A. S.; Wright, J. (1987) - *The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis*. Histopathology, vol. 11, p. 1295-1305.
- Li, W.; Alfaidy, N.; Challis, J. R. (2004) - *Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term labor*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 89, p. 2897-2904.
- Lipman, N. S.; Jacson, L. R.; Trudel, L. J.; et al. (2005) - *Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications and information resources*. Ilar Journal, vol. 46, p. 258-268.
- Lorenzoni, S. R. G. (2010) - *Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo*. Dissertação de mestrado, Faculdade Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Loureiro, J.; Schilte, M.; Aguilera, A.; Albar-Vizcaino, P.; Ramirez-Huesca, M.; Perez-Lozano, M. L.; et al. (2010) - *BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure*. Nephrol Dial Transplant, vol. 25, p. 1098-1108.
- Mandal, A. (2019) - *Semen Physiology*. Medical Life Sciences.
- Mann, D. M.; Yamaguchi, Y.; Bourdon, M. A.; Ruoslahti, E. (1990) - *Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 265, no. 9, p. 5317-5323.
- Masseno, A. P. B. (2009) - *Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Masseno, A. P. B. (2012) - *Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa das éguas*. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Masseno, A. P. B.; Porto, C. D.; Nunes, L. C.; Sequeira, J. L.; Alvarenga, M. A. (2010) - *Miofibroblastos: revisão de literatura*. Veterinária e Zootecnia, vol.17, no. 2, p. 177-190.

- McCue, Patrick. (2014) - *Evaluation of pH and Osmolarity of Semen*. Equine Reproductive Procedures, John Wiley & Sons, Inc, cp. 122, ISBN: 9781118904398
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Harrison, L. A., Blach, E. L. & Shideler, R. K. (1988) - *Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles*. Journal of the American Veterinary Medical Association, vol. 192, p. 350-353.
- Mohan, R. R.; Tovey, J. C. K.; Sharma, A.; Tandom, A. (2011) - *Decorin biology, expression, function and therapy in cornea*. Current Molecular Medicine, vol.11, no.2, p.110-128.
- Murphy, R. M.; Lamb, G. D. (2013) - *Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes*. The Journal of Physiology, vol. 591, p. 5823-5831.
- Murphy, R. M.; Larkins, N. T.; Mollica, J.P.; Beard, N. A.; Lamb, G. D. (2009) - *Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast and slow twitch fibers of rat*. The Journal of Physiology, vol. 587, p. 443-460.
- Nadji, M. (1986) - *Immunoperoxidase techniques*. I. Facts and artifacts, American Journal of Dermatopathology, vol. 8, p. 32-36.
- Neill, T.; Schaefer, L.; Iozzo, R. V. (2012) - *Decorin: a guardian from the matrix*. American Journal of Pathology, vol. 181, p. 380-387.
- Neilson, E. G. (2006) - *Mechanisms of disease: fibroblasts – a new look at an old problem*. Nature Clinical Practice Nephrology, vol. 2, p. 101-108.
- Noguchi, Y.; Sato, T.; Hirata, M.; Hara, T.; Ohama, K.; Ito, A. (2003) - *Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during menstrual cycle in vivo and in vitro*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 88, p. 6063-6072.
- Ono, Y. J.; Terai, Y.; Tanabe, A.; Hayashi, A.; Hayashi, M.; Yamashita, Y.; Kyo, S.; Ohmichi, M. (2014) - *Decorin induced by progesterone plays a crucial role in suppressing endometriosis*. Journal of Endocrinology, vol. 223, p. 203-216.
- Paccamonti, D.L., Buiten, A.V., Parlevliet, J.M., Colenbrander, B. (1999). *Reproductive parameters of miniature stallions*. Theriogenology, 51, p. 1343-1349.
- Payne, K. J. Clyde, L. A. Weldon, A. J.; Milford, T. A.; Yellon, S.M. (2012) - *Residency and activation of myeloid cells during remodeling of the prepartum murine cervix*. Biol. Reprod., vol. 87, p. 106.
- Petrov, V. V.; Fagard, R. H.; Lijnen, P. J. (2002) - *Stimulation of collagen production by transforming growth factor- β 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts*. Hypertension, vol. 39, p. 258-263.
- Pickett, B.W., Voss, J.L., Bowen, R.A., Squires, E.L., McKinnon, A.O. (1987). *Seminal characteristics and total scrotal width (TSW) of normal and abnormal stallions*. Proc 33'd Annu Conv Am Assoc Equine Pratt 487-518.

- Rickert, R. R., Maliniak, R. M. (1989) - *Intralaboratory quality assurance of immunohistochemical procedures*. Recommended practices for daily application. Arch Pathol Lab Med, vol. 113, p. 673-679.
- Rigby, S. L.; Brinsko, S. P.; Cochran, M.; et al. (2001) - *Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender*. Animal Reproduction Science, vol. 68, p.171-180.
- Rebordão, M. R.; et al. (2014) - *What is new on the physiopathology of endometriosis in the mare?* Journal Pferdeheilkunde, Baden-Baden, vol. 30, p. 15-18.
- Reese, S. P.; Underwood, C. J.; Weiss, J. A. (2013) - *Effects of decorin proteoglycan on fibrillogenesis, ultrastructure and mechanics of type I collagen gels*. Matrix Biology, vol. 32, p. 414-423.
- Reed, C. C.; Iozzo, R. V. (2002) - *The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis*. Glycoconjugate Journal, vol. 19, p. 249-255.
- Reiswig, J. D.; Threlfall, W. R.; Rosol, T. J. (1993) - *A comparison of endometrial biopsy, culture and cytology during oestrus and dioestrus in the horse*. Equine Veterinary Journal, vol. 1, p. 240-241.
- Rosai, J. (1996) - *Special techniques in surgical pathology*. In: ed. Ackerman's Surgical Pathology. New-York: Mosby-Year Book, p. 29-62.
- Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. (1991) - *Proteoglycans as modulators of growth factor activities*. Cell, vol. 64, no. 5, p. 867-869.
- Saxena, D. K.; Oh-Oka, T.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, T.; Toshimori, K. (2002) - *Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice*. Reproduction, vol. 123, p. 435-444.
- Schaeter, L.; Raslik, I.; Grone, H. J. Schonherr, E.; Macakova, K.; Ugorcakova, J.; et al. (2001) - *Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican and fibromodulin*. FASEB Journal, vol. 18, p. 559-561.
- Schaeter, L.; Macakova, K.; Raslik, I.; Micegova, M.; Grone, H. J. Schonherr, E.; et al. (2002) - *Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction*. American Journal of Pathology, vol. 160, p. 1181-1191.
- Seidal, T.; Balaton, A. J.; Battifora, H. (2001) - *Interpretation and quantification of immunostains*. American Journal of Surgery Pathology, vol. 25, p. 1204-1207.
- Sieme, H.; Martinsson, G.; Rauterberg, H.; Walter, K.; Aurich, C.; Petzold, R.; Klug, E. (2003) - *Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen*. Animal Reproduction Science, vol. 38, p. 134-140.
- Sieme, H.; Knop, K.; Rath, D. (2005) - *Effects of duration, force of centrifugation and cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability*. Havemeyer Foundation Mono Series, vol. 18, p. 6-9.
- Silva, A. T. M. (2013) - *Hipologia – Guia para o Estudo do Cavalo*. LIDEL – Edições Técnicas, Lda., Lisboa, p.139-148. ISBN: 978972757601

- Silva, C. A. M.; Barros, S. S.; Esquerre, R. A. (1987) - *A biopsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua*. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, vol.7, p. 131-133.
- Simon-Chazottes, C.; Matsubara, S.; Miyauchi, T.; Marumatsu, T.; Guenet, J. L. (1992) - *Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potencial importance in development: Midkine (Mdk) and basigin (Bsg)*. Mamm. Genome, vol.2, p.269-271.
- Sini, P.; Denti, A.; Tira, M. E.; Balduini, C. (1997) - *Role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen*. Glycoconjugate Journal, vol.14, p. 871-874.
- Smedts, A. M.; Curry, T. E. Jr. (2005) - *Expression of basigin na inducer of matrix metalloproteinases, in rat ovary*. Biology of Reproduction, vol. 73, p. 80-87.
- Smedts, A. M.; Lele, S. M.; Modesitt, S. C.; Curry, T. E. (2006) - *Expression of an extracelular matrix metalloproteinase inducer (basigin) in the human ovary and ovarian endometriosis*. Fertil Steril, vol. 86, p. 535-542.
- Smejkal, G.; Gallagher, S. (1994) - *Determination of semidry protein transfer efficiency with transverse gradient gel electrophoresis*. BioTechniques, vol. 16, p. 196-198.
- Squires, E. L.; Keith, S. L.; Graham, J. K. (2004) - *Evaluation alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa*. Theriogenology, vol. 62, p.1056-1065.
- Schmidt, G.; Hausser, H.; Kresse, H. (1991) - *Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin: involvement of the sequence NKISK of the core protein*. Biochem. J. vol. 280, p. 411-414.
- Schonherr, E.; Hausser, H; Beavan, L.; Kresse, H. (1995) - *Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein binding domains*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 8877-8883.
- Schonherr, E.; Sunderkotter, C.; Iozzo, R. V.; Schaefer, L. (2005) - *Decorin, a Novel Player in the Insulin-like Growth Factor System*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p.15767-15772.
- Taylor, C. R. (2000) - *The total test approach to standartization of immunohistochemistry*. Arch Pathol Lab Med, vol.124, p.1185-1191.
- Taylor, C. R.; Cole, R. J. (1994) - *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for surgical pathologist*. In: ed. Major Problems in Pathology. New-York: WB Saunders.
- Taylor, S. C.; Berkelman, T.; Yadav, G.; Hammond, M. (2013) - *A defined methodology for reliable quantification of western blot data*. Molecular biotechnology, vol. 55, p. 217-226.
- Thannickal, V. J. (2012) - *Mechanisms of pulmonary fibrosis: role of activated myofibroblasts and NADPH oxidase*. Fibrogenesis & Tissue Repair, vol.5, no. 23.
- Towbin, H; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979) - *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academe of Scienses of the United States of America, vol.79, p. 4350-4354.
- Tyler, R. E.; Pearce, M. M.; Shaler, T. A.; Olzmann, J. A.; Greenblatt, E. J.; Kopito, R. R. (2012) - *Unassembled CD147 is an endogenous endoplasmic reticulum-associated degradation substrate*. Mol. Biol. Cell, vol. 23, p. 4668-4678.

- Vanderwall, D. K. (2008) - *How to process dilute ejaculate of semen for cooled-transported insemination, in Proceedings*. Am Assoc Equine Pract., vol.54, p. 369-373.
- Varner, D. D.; Love, C. C.; Blanchard, T. L.; et al. (2010) - *Breeding-management strategies and semen-handling techniques for stallions-case scenarios, in Proceedings*. Am Assoc Equine Pract., vol.56, p. 215-226.
- Vial, C.; Gutiérrez, J.; Santander, C.; Cabrera, D.; Brandan, E. (2011) - *Decorin interacts with connective tissue growth factor (CTGF)/CCN2 by LRR12 inhibiting its biological activity*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 286, no. 27, p. 242-252.
- Walter, I.; Handler, J.; Reifinger, M.; Aurich, C. (2001) - *Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins*. Reproduction, vol. 121, p. 581-586.
- Walter, I. Handler, J.; Moller, I.; Aurich, C. (2005) - *Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometriosis*. Histology and Histopathology, vol. 20, no. 4, p.1105-1113.
- Weidle, U. H.; Scheuer, W.; Eggle, D.; Klostermann, S.; Stockinger, H. (2010) - *Cancer related issues of CD147*. Cancer Genomics Proteomics, vol. 7, p. 157-169.
- Wick, M. R. (1995) - *Algorithmic immunohistologic analysis of undifferentiated neoplasms*. United States na Canadian Academy of Pathology Annual Meeting.
- White, I. G. (1993) - *Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold-shock and preservation: a review*. Reprod Fertil Dev., vol. 5, p. 639-658.
- Xiao, L. J.; Chang, H.; Ding, N. Z.; Ni, H.; Kadomatsu, K.; Yang, Z. M. (2002) - *Basigin expression and hormonal regulation in mouse uterus during the peri-implantation period*. Molecular Reproduction and Development, vol. 63, p. 47-54.
- Yamaguchi, Y. and Ruoslahti, E. (1988) - *Expression of human proteoglycan in chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation*. Nature, vol. 336, no. 6196, p. 244-246.
- Yamaguchi, Y.; Mann, D. M.; Ruoslahti, E. (1990) - *Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin*. Nature, vol. 346, no. 6281, p. 281-284.
- Zhu, J.; Li, Y.; Shen, W; et al. (2007) - *Relationships between transforming growth factor- β , myostatin and decorin: implication for skeletal muscle fibrosis*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 282, no. 35, p. 25852-25863.