

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ- UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E
SAÚDE ANIMAL**

Maycon Araujo Ruivo

**EFEITO DA ADIÇÃO DE FRAÇÕES PROTEICAS DO PLASMA SEMINAL DE
OVINOS NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO PÓS
DESCONGELAÇÃO**

Umuarama - PR

Fevereiro/2018

Maycon Araujo Ruivo

**EFEITO DA ADIÇÃO DE FRAÇÕES PROTEICAS DO PLASMA SEMINAL DE
OVINOS NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO PÓS
DESCONGELAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal (PPS), nível Mestrado, da Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama, como exigência para obtenção do grau de Mestre em Produção Sustentável e Saúde Animal.

Área de concentração: Saúde Animal
Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

Umuarama - PR

Fevereiro/2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

R934e Ruivo, Maycon Araujo
Efeito da adição de frações proteicas do plasma seminal de ovinos na viabilidade espermática do sêmen equino pós descongelamento / Maycon Araujo Ruivo. -- Umuarama, PR, 2018.
58 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas.
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, 2018.

1. Reprodução animal. 2. Carneiros - Reprodução. 3. Cavalos - Reprodução. 4. Proteoma. I. Seixas, Flávio Augusto Vicente, orient. II. Martinez, Antonio Campanha, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.082

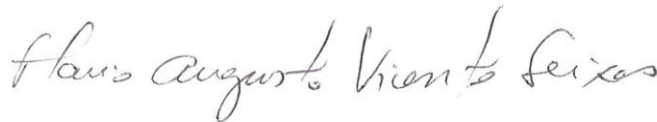
FOLHA DE APROVAÇÃO

Maycon Araujo Ruivo

Efeito da Adição de Frações Proteicas do Plasma Seminal de Ovinos na Viabilidade
Espermática do Sêmen Equino Pós Descongelação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



Prof. Dr. Marco Aurelio Schüler de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá (Membro)



Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Membro)

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2018.

Local da defesa: Sala 07 do bloco A, DTC, Campus Regional de Umuarama-UEM

DEDICATÓRIA

**Dedico esta obra a minha
família, em especial a minha mãe
Ezilda Carneiro Araujo, ao meu pai
Rivail Ruivo e ao meu irmão
Willian Araujo Ruivo.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha família, que é o meu chão, e sempre será a minha base para qualquer tomada de decisão. Agradeço a todos da minha família, tanto do lado dos Araujo, quanto dos Ruivo, pois todos são muito importantes para mim. Em especial a minha querida e exemplar mãe, Ezilda Carneiro Araujo, e ao meu querido e dedicado pai, Rivail Ruivo. Estes dois são fundamentais para minha vida, pois sem eles com certeza eu não seria quem sou hoje. Ambos sempre me incentivaram e proporcionaram as oportunidades para eu ter cada vez mais forças para lutar e ser alguém útil para o mundo, sem nunca se esquecer das minhas raízes.

Ao meu grande irmão Willian Araujo Ruivo, que vem a cada dia me surpreendendo pela inteligência, força e garra que têm, nunca deixando de lado o seu imenso coração.

Aos demais primos, primas, tios e tias, além do meu avô e minha avó, não farei menções específicas, mas agradeço a todos de forma geral por serem pessoas tão boas, que estão sempre batalhando em busca de uma vida melhor, com dignidade, sem passar por cima de ninguém. Quero que todos saibam, que apesar da distância que nos separa, sempre foram e sempre serão muito importantes para mim.

À ilustre Luciana Maffini Heller, pessoa que tenho o prazer de estar conhecendo cada vez mais e a cada dia que passa tenho mais certeza da grande pessoa que é. Saiba que você é e está se tornando cada vez mais importante para mim.

Aos meus amigos/irmãos integrantes da eterna República Curva de Rio, juntamente com seus diversos agregados, o meu muito obrigado por serem meus parceiros. Optei por não colocar o nome de todos aqui, senão a lista seria bem grande, mas sintam-se todos fortemente abraçados.

À minha nobre Universidade Estadual de Maringá-UEM, por me proporcionar a graduação e agora também a Pós-Graduação. Esta instituição foi um divisor de águas na minha vida!

Aos professores que tanto me auxiliaram nessa longa jornada. Em especial ao professor Welber Daniel Zanetti Lopes e Antonio Campanha Martinez, que me “pegaram para criar”, aconselhando, e dando dicas preciosas, além de toda confiança depositada. E mais recentemente, mas não menos importante, o competente Flavio Augusto Vicente Seixas, que me orientou muito bem e soube lidar com todas as adversidades.

Ao pessoal da Reprodução Animal e do Laboratório de Bioquímica da UEM, muito obrigado pelo apoio nas diferentes etapas o experimento. Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao pessoal da Cooperativa Agroindustrial de Carnes Nobres Caiuá – COOPERCAIUÁ, por me propiciar a possibilidade do trabalho e do estudo de forma conjunta.

À Fundação Araucária, que deu o apoio financeiro para realização desse projeto.

A todos, que de alguma maneira me ajudaram nesse período de mestrado e na realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“A diferença entre uma pessoa e outra é a determinação, uma forma diferente de energia. Essa qualidade humana completará qualquer tarefa que precise ser realizada no mundo, e de nada adiantam talento, circunstâncias ou oportunidades, sem a sua presença poderosa”

Thomas Buxton.

Efeito da Adição de Frações Proteicas do Plasma Seminal de Ovinos na Viabilidade Espermática do Sêmen Equino Pós Descongelação

Resumo geral

A inseminação artificial com uso de sêmen congelado vem sendo cada vez mais utilizada em equinos. Em algumas espécies, como nos ovinos e bovinos, consegue-se boas taxas de prenhez por meio desta técnica, já nos equinos, estes índices oscilam muito, sendo em geral, muito baixos na comparação com estas duas espécies. No plasma seminal dos ovinos, as proteínas de baixo peso molecular (13-15 kDa) são o componente majoritário, já no de equinos, as quantidades destas proteínas são bem menores. Estudos recentes sugerem que uma classe dessas proteínas de baixo peso molecular pode desempenhar em ovinos, um papel importante na viabilidade dos espermatozoides, tanto na utilização de sêmen fresco, como congelado. Sabendo que o sêmen de garanhões, em geral não apresenta boa qualidade após a criopreservação comparada ao de ovinos, esse projeto teve por objetivo purificar as proteínas com baixo peso molecular existentes no plasma seminal de ovinos e utiliza-las como adjuvante ao diluente do sêmen equino antes da congelação, no intuito de avaliar a possível melhoria da viabilidade espermática do sêmen equino. Para isso, amostras de sêmen de carneiros da raça Dorper foram coletadas e o plasma separado por centrifugação. As frações proteicas foram purificadas por técnicas de filtração em gel e a pureza checada por meio de SDS-PAGE. Duas frações proteicas com peso molecular de 13 e 15 kDa foram isoladas, concentradas e misturadas ao sêmen equino fresco na proporção de 0, 1× e 2×, sendo este imediatamente congelado. As amostras permaneceram estocadas em nitrogênio líquido por 35 dias. O sêmen descongelado foi avaliado por meio do sistema computadorizado CASA. Após a descongelação, as análises mostraram que, quando as proteínas foram adicionadas na proporção de 1×, a fração 2 melhorou a motilidade e a fração 3 melhorou a motilidade e o vigor. Na proporção de 2×, a fração 2 diminuiu a motilidade e o vigor enquanto que, a fração 3 melhorou o vigor. Concluímos que a adição da fração 2, de proteínas com 15 kDa, promoveu efeito inibitório significativo sobre a motilidade e vigor, enquanto que a adição da fração 3, com proteínas de 13 kDa, promoveu melhora expressiva no vigor sem afetar a motilidade. Diferentes frações de proteínas do plasma seminal podem ter efeitos distintos sobre a viabilidade dos espermatozoides de maneira dependente da concentração.

Palavras-chave: Carneiro, cavalo, proteoma, reprodução animal.

Effect of the Addition of Seminal Plasma Protein Fractions from Sheep on the Sperm Viability of the Equine Semen at Post Thawing.

General abstract

Artificial insemination using frozen semen has been increasingly applied in horses. In other species, such as rams and bulls, good pregnancy rates are achieved by this technique. In stallions, these rates fluctuate a lot, generally being very low in comparison with these two species. In rams seminal plasma, the low molecular weight proteins (13-15 kDa) are the major component, while in horses, the amount of these proteins are much smaller. Recent studies suggest that a class of these low molecular weight proteins may play a role in the viability of spermatozoa in either fresh or frozen semen. Since the stallion semen usually does not show good quality after cryopreservation compared to rams, this project aimed to purify the low molecular weight proteins from seminal plasma of rams and use them as an adjuvant to the equine semen diluent before freezing, in order to evaluate the possible improvement in the viability of stallion sperm. Firstly, semen samples from rams of the Dorper breed were collected and the plasma separated by centrifugation. The protein fractions were purified by gel filtration techniques and the purity checked by means of SDS-PAGE. Two proteins fractions with molecular weight close to 13 and 15 kDa were isolated, concentrated and mixed to fresh equine semen at the ratio of 0, 1 × e 2 ×, being immediately frozen. The samples were stored in liquid nitrogen for 35 days. The thawed semen was evaluated through the CASA computerized system and the analyzes showed that, when proteins were added in the proportion of 1 ×, the fraction 2 improved motility and fraction 3 improved both motility and vigor. In the proportion of 2 ×, fraction 2 decreased both motility and vigor, while fraction 3 improved vigor. We concluded that the addition of fraction 2, of proteins with 15 kDa, promoted a significant inhibitory effect on motility and vigor, whereas the addition of fraction 3, with 13 kDa, promoted significant improvement in vigor without affecting the motility. Different fractions of seminal plasma proteins may have distinct effects on sperm viability in a concentration-dependent manner.

Key words: Rams, stallion, proteome, animal breeding.

LISTA DE FIGURAS

- Figura R1.** Esquema de cromatografia em coluna. A coluna cromatográfica é composta pela fase estacionária (matriz porosa) e pela fase móvel (solução). Além da coluna, no esquema é demonstrado o reservatório (contém a amostra a ser purificada), o detector, o registrador e o coletor das frações purificadas.....24
- Figura R2.** Cromatografia de exclusão por tamanho - A mistura de proteínas é adicionada à coluna que contém um polímero com ligações cruzadas. As moléculas de proteínas separam-se por tamanho, onde moléculas maiores passam mais livremente, aparecendo nas frações iniciais.....25
- Figura 01.** Design experimental ilustrando as concentrações das frações proteicas nos diferentes grupos/tubos tratados.....39
- Figura 02.** Gel SDS-PAGE a 15% mostrando as proteínas do plasma seminal de ovinos. Os poços 1 e 6 mostram as frações totais do plasma seminal em 2 diferentes concentrações. Os poços 2 e 4 mostram a banda correspondente ao pico 2 da figura 2B. Os poços 3 e 5 mostram a banda correspondente ao pico 3 da figura 2B. O poço 7 mostra o marcador Sigma Marker wide range S8445.....41
- Figura 03.** (A) Perfil de eluição do plasma seminal em gel de Sephadex G25. O pico 1 que continha as proteínas seminais foi concentrado e inserido na segunda coluna. (B) Perfil de eluição das proteínas do plasma seminal em gel de Sephacryl S200. Os picos 2 (fração 2) e 3 (fração 3) correspondem as proteínas com peso molecular próximo de 15 kDa.....42
- Figura 04.** Parâmetros da viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas da fração 2. Cada ponto no gráfico representa a média de avaliações de cinco palhetas descongeladas.....44
- Figura 05.** Parâmetros da viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três condições avaliadas da fração 3. Cada ponto no gráfico representa a média de cinco avaliações (palhetas descongeladas).....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Valores obtidos dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das concentrações testadas (negrito) para o sêmen tratado com a fração 2. A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição variou em relação ao controle. Valores positivos indicam melhora enquanto que valores negativos indicam piora na condição.....45

Tabela 02. Valores obtidos dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das concentrações testadas (negrito) para o sêmen tratado com a fração 3. A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição variou em relação ao controle. Valores positivos indicam melhora enquanto que valores negativos indicam piora na condição.....47

LISTA DE ABREVIACOES

| | |
|-----------------------------------|--|
| μL | Microlitro |
| AQN-1/ AQN-3/ AWN/PSP-I/PSP-II | Espermadesinas de Suínos |
| aSFP | Acidic Seminal Fluid Protein |
| Bdh-1/Bdh-2/Bdh-3/Bdh-4/BSFP | Espermadesinas de Caprinos |
| BSPs | Bovine Seminal Plasma |
| CASA | Computer Assisted Sperm Analysis |
| cm | Centímetros |
| CRISPs | Cysteine Rich Secretory Proteins |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| Fn-tipo II | Proteínas Fibronectinas tipo II |
| G | Força G |
| g.dL | Gramas por decilitro |
| HSP-1, HSP-2, HSP-6, HSP-7, HSP-8 | Horse Seminal Protein |
| kDa | quilo Daltons |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| N ₂ | Nitrogênio |
| nm | Nanômetro |
| °C | Graus Celsius |
| PAGE | Eletroforese em Gel de Poli-Acrilamida |
| SDS-PAGE | Dodecil Sulfato de Sódio |
| Z13 | Espermadesina dos Bovinos |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| PREFÁCIO..... | 13 |
| PARTE I - ELEMENTOS TEXTUAIS..... | 14 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 1.1. Equinocultura..... | 15 |
| 1.2. As biotecnologias reprodutivas na Equinocultura..... | 15 |
| 1.3. Sêmen congelado em Equinos..... | 17 |
| 1.4. Proteômica seminal..... | 19 |
| 1.4.1. Proteínas de baixo peso molecular..... | 20 |
| 1.4.2. Influência das proteínas seminais na congelação do sêmen equino..... | 21 |
| 1.5. Cromatografia de filtração gel segundo Nelson e Cox, (2014) | 23 |
| 1.6. Referências..... | 26 |
| PARTE II - ARTIGO CIENTÍFICO..... | 32 |
| Efeito da Adição de Frações Proteicas do Plasma Seminal de Ovinos na Viabilidade Espermática do Sêmen Equino Pós Descongelação..... | 33 |
| Resumo..... | 34 |
| Introdução..... | 35 |
| Material e Métodos..... | 37 |
| <i>Coleta do sêmen.....</i> | <i>37</i> |
| <i>Purificação das proteínas.....</i> | <i>37</i> |
| <i>Congelação do sêmen equino.....</i> | <i>38</i> |
| <i>Análise da viabilidade espermática pós-descongelação.....</i> | <i>39</i> |
| <i>Análise Estatística.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Comitê de Ética.....</i> | <i>40</i> |
| Resultados e Discussão..... | 40 |
| <i>Purificação das proteínas do plasma seminal ovino.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Criopreservação do sêmen equino tratado.....</i> | <i>43</i> |
| Conclusões..... | 49 |
| Agradecimentos..... | 49 |
| Ensaio em andamento e perspectivas futuras..... | 49 |
| Referências..... | 50 |
| PARTE III - ELEMENTOS PÓS TEXTUAIS..... | 53 |
| ANEXO 1. Normas de submissão do artigo para a revista Animal Reproduction Science..... | 54 |

PREFÁCIO

Essa dissertação foi redigida em três seções, sendo a primeira composta pelos quesitos pré-textuais, onde estão inclusos o resumo, abstract e a revisão de literatura redigida nas normas da ABNT. Na segunda parte é apresentado o trabalho na forma de artigo científico, escrito as normas da Revista *Animal Reproduction Science* (ISSN: 0378-4320), revista a qual será submetido, e a terceira parte apresenta as normas da revista.

PARTE I - ELEMENTOS TEXTUAIS

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Equinocultura

O equino é uma espécie que foi domesticada há séculos pelo homem, sendo utilizado desde então nas mais variadas atividades. A equinocultura sempre foi e está sendo cada vez mais um segmento agropecuário de grande importância econômica em diversos países do mundo. No Brasil, dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mostram que a indústria de equinos cresceu quase 12% ao ano nos últimos 10 anos (LIMA e CINTRA, 2016). Em 2006 eram R\$7,5 bilhões de faturamento bruto anual, e em 2015 foram 16 bilhões de reais. Este segmento promove a geração de aproximadamente 610 mil empregos diretos e mais de dois mil empregos indiretos, sendo responsável por três milhões de vagas de trabalho (LIMA e CINTRA, 2016) e empregam até cinco vezes mais que a indústria automobilística e aeroespacial brasileira (SOARES, 2015).

Esse crescimento observado no mercado dos equinos nas últimas décadas ocorreu principalmente pelo fato do aumento do uso dos cavalos no segmento esportivo. Os equinos não são mais apenas destinados ao transporte ou tração animal, cada vez mais estão sendo utilizados nas diversas atividades de esporte e de lazer.

Segundo estimativa da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), mais de 50% dos equinos de todo o mundo se encontram nas Américas, sendo os Estados Unidos o país com maior número de animais. O Brasil se encontra na quarta posição, com mais de cinco milhões de equinos em seu território (FAO, 2016), e é no Sudeste do Brasil onde se encontra a maior quantidade de equinos, seguido pelas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte (MAPA, 2017).

1.2. As biotecnologias reprodutivas na Equinocultura

Por muito tempo os equinos foram rotulados como animais domésticos de baixa fertilidade, e esse fato era atribuído a características da seleção genética empregada nessa espécie (GINTHER, 1992). Na seleção dos equinos, geralmente da-se pouca ou nenhuma importância para a fertilidade, onde os animais de melhor desempenho atlético e melhor fênótipo são os escolhidos para reprodução (ALVARENGA et al., 2017), mesmo que sejam animais de comprovada ineficiência reprodutiva, fazendo com que essa genética seja repassada a seus descendentes (PARADIS, 2002). Os marcadores de fertilidade são

altamente hereditários e a prática da constante utilização de garanhões sem se preocupar com a capacidade reprodutiva, contornando a subfertilidade através do uso de tecnologias de reprodução assistida, resultou em populações de equinos com taxas de concepção significativamente menores do que outras espécies (NATH et al., 2010).

Um dos fatores mais importantes para a melhoria das taxas de fertilidade e que auxiliou na expansão do mercado dos equinos foi a utilização e otimização das biotecnologias aplicadas a reprodução, pois estas proporcionam a obtenção de um maior número de animais melhorados geneticamente, num espaço de tempo menor (GOMES e GOMES, 2009) e possibilitam a reprodução de animais que apresentam baixa fertilidade, porém, alto valor econômico (PARADIS, 2002).

No assunto reprodução equina, o Brasil é referência a nível mundial (SCHUTZER, 2012), e ainda existe um grande espaço para pesquisa e para maior adesão no uso das biotecnologias reprodutivas, devido às inúmeras vantagens que podem ser obtidas através da utilização destas (GOMES e GOMES, 2009).

A biotecnologia da reprodução mais utilizada em equinos é a inseminação artificial, que pode ser realizada por meio de sêmen *in natura* diluído, diluído-transportado, diluído-resfriado-transportado e congelado (CARVALHO, 1992), sendo o método mais empregado em equinos a inseminação artificial utilizando sêmen resfriado (LOOMIS, 2006). Contudo, durante muito tempo, o uso da inseminação artificial em equinos foi restrito, devido a não aprovação por parte das associações de raças (SAMPER, et al., 2006). Após a aceitação do registro de animais gerados a partir do uso de biotecnologias por parte de várias associações, foi que houve uma maior difusão das técnicas em todo o mundo (PAPA et al., 2005)

Em muitos países europeus, grande parte das éguas destinadas a reprodução são inseminadas, sendo a maioria destas inseminações realizada por meio de sêmen resfriado (AURICH e AURICH, 2006). Dados da principal central de reprodução da Alemanha mostram que 90% das éguas da raça Hanoveriana, a principal raça Alemã, são concebidas por meio da inseminação artificial (AURICH e AURICH, 2006). Na Austrália não é diferente, pois 90% dos potros da raça Standardbred são oriundos de inseminação com sêmen congelado ou resfriado (NATH et al., 2010). Já no Brasil, de acordo com Canisso et al. (2008), não existem estatísticas oficiais sobre a inseminação artificial em equinos, contudo, estes autores afirmam que boa parte do plantel está sendo inseminado anualmente

e métodos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para as raças e realidade brasileiras. De acordo com Alvarenga et al. (2016), aproximadamente 20% das éguas doadoras de embriões foram geradas a partir de sêmen congelado no Brasil.

1.3. Sêmen congelado em Equinos

Os primeiros estudos sobre inseminação artificial em equinos foram relatados na Rússia em 1899 (IVANOFF, 1922; FOOTE, 2002). Nos Estados Unidos, a técnica empregada em equinos chegou mais tarde, somente no ano de 1939 (SOUZA, 2006).

O sucesso da técnica da criopreservação foi conseguido por Polge et al. (1949) trabalhando com sêmen de aves. Em equinos, o relato da primeira gestação equina com uso de sêmen congelado foi no ano de 1957 (PICKETT e AMANN, 1993).

Com os avanços na criopreservação de sêmen em bovinos a partir da década de 50, e com o evento da primeira gestação equina em 1957, observou-se um crescente interesse pela criopreservação de sêmen equino, contudo, a difusão do sêmen congelado em bovinos foi gigantesca, o que não aconteceu nos equinos (SOUZA, 2006).

A inseminação artificial com uso de sêmen congelado proporciona inúmeras vantagens, como propagação rápida do DNA de um garanhão de alto valor genético, uso do sêmen mesmo após o óbito do animal, prevenção do risco de doenças, preservação de características raciais ou linhagens que no momento não sejam de interesse, funcionando como um banco genético, e principalmente a estocagem, pois, permite o transporte do sêmen a longas distâncias ou locais de difícil acesso, sem a necessidade de tempo pré-determinado para se realizar a inseminação após a colheita do sêmen (MILLER, 2008; ALVARENGA et al., 2016).

Comparado com o sêmen refrigerado, que se mantém viável até aproximadamente 72 horas após a coleta, o sêmen congelado tem sua viabilidade por tempo indefinido, desde que criopreservado da maneira correta, pois nesse caso há a interrupção do metabolismo dos espermatozoides após o procedimento de congelamento (GIBB e AITKEN, 2016).

O sucesso da técnica de inseminação artificial com sêmen congelado ocorre em algumas espécies, como é o caso dos bovinos e ovinos. Vários são os estudos que demonstram o êxito da utilização da técnica de inseminação artificial usando o sêmen congelado nos bovinos, onde as taxas de prenhez observadas comumente giram entre 40 e

70% (AYRES et al., 2006; SÁ FILHO et al., 2010), bem como em ovinos, comumente observadas taxas entre 40 e 70% (GIL et al., 2003; FUKUI et al., 2008; HIWASA et al., 2009). Em ambas as espécies (bovinos e ovinos), os índices obtidos na inseminação artificial com uso de sêmen congelado são satisfatórios, já nos equinos, estes índices são muito variáveis, oscilando geralmente entre 25 e 50% (BARBACINI et al., 2005; HOFFMANN et al., 2011).

O uso do sêmen congelado em equinos tem vários pontos positivos, entretanto, de forma geral, os índices obtidos são muito inferiores quando comparados ao sêmen fresco ou refrigerado (WATSON, 2000; TERRACIANO, 2009). Geralmente, as taxas de gestação são superiores usando o sêmen fresco, comparado ao sêmen refrigerado, que por sua vez, tem taxas superiores ao congelado (LOOMIS, 2001). Além de que, há uma diferença muito grande entre ganhões, no que diz respeito ao processo de criopreservação, pois alguns têm boa qualidade pós-descongelamento e outros não (GOMES et al., 2002; HARTWIG et al., 2014), ocasionando uma barreira para a maior utilização da técnica (BATELLIER et al., 2001; CARMO e ALMEIDA 2006; LOOMIS e GRAHAM (2008). Alvarenga et al. (1996) demonstraram que ganhões das raças germânicas de hipismo e cavalos da raça quarto de milha possuem melhores parâmetros espermáticos após a congelamento do sêmen, quando comparados ao Mangalarga marchador por exemplo e animais de origem ibérica.

Devido a grande variabilidade na resposta para a criopreservação do sêmen entre as diferentes raças equinas e até mesmo a variação individual dos ganhões dentro de cada raça, na prática há uma classificação dos ganhões, que podem ser classificados como ganhões de alta (*good coolers*) ou baixa congelabilidade (*bad coolers*) (AURICH, 2008).

Diversos são os fatores que podem estar envolvidos na qualidade do sêmen dos ganhões pós-descongelamento, sendo a composição da membrana plasmática juntamente com os fatores genéticos do ganhão os principais determinantes na resistência dos espermatozoides em suportar os danos causados pela criopreservação (RAMIRES et al., 2016). É imprescindível que a membrana plasmática e acrossomal estejam com sua integridade preservada para que o espermatozóide apresente viabilidade, pois estão diretamente ligadas nos processos de capacitação, reação acrossomal, ligação com a zona pelúcida e de fusão dos gametas (NEILD et al., 2000).

De acordo com Pickett e Amann (1993), para o sucesso da técnica da criopreservação, que se resume em conceber a gestação, o metabolismo do espermatozóide

deve estar preservado após a descongelação para a sua produção de energia, deve apresentar também boa motilidade progressiva, bem como enzimas acrossomais íntegras, as quais são de extrema importância para a penetração do ovócito, além de proteínas de membrana plasmática funcionais, pois são fundamentais para a sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino.

1.4. Proteômica seminal

A ejaculação resulta na confluência dos espermatozoides a partir da cauda do epidídimo, com o plasma rico em proteínas provenientes das glândulas sexuais acessórias. O plasma seminal dos equinos é produto da secreção dos epidídimos, das ampolas dos ductos deferentes, das vesículas seminais, da próstata e das glândulas bulbo uretrais, sendo os epidídimos, nessa espécie, os principais responsáveis pela produção de grande parte das proteínas seminais (DACHEUX et al., 2003). O plasma, é um veículo líquido tamponado para a deposição dos espermatozoides, que posteriormente nadam livres e interagem com os fluidos e as células do trato feminino (LEAHY e GRAAF, 2012).

O principal componente do plasma seminal (em peso) são as proteínas, e estas são consideradas como as moduladoras dominantes da função espermática, pois contribuem de forma marcante na regulação da maior parte das funções (LEAHY e GRAAF, 2012; Garcia et al., 2014), influenciando na habilidade do espermatozoide em fertilizar, e também agem na fisiologia da fêmea (TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

Existe grande variação entre as proteínas do plasma seminal nas diferentes espécies, e isso se dá principalmente devido a diferenças na contribuição relativa das glândulas sexuais acessórias (MANN, 1964; DRUART et al., 2013). As interações dos componentes do plasma seminal e das proteínas de membrana dos espermatozoides podem ser responsáveis pelas diferenças na fertilidade e na congelabilidade do sêmen, em resposta a variações na composição proteica (RONCOLETTA et al., 2004; BEZERRA, 2015).

Nas espécies unguladas, são três as principais classes de proteínas do plasma seminal, sendo elas: as fibronectinas do tipo II (Fn-tipo II), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) e as espermadesinas (TOPFER-PETERSEN et al., 2005), bem como nos equinos, espécie na qual as principais proteínas do plasma seminal também pertencem a esses três grupos (TOPFER-PETERSEN et al., 2005; KARESKOSKI e KATILA, 2008).

Se tratando de quantificação proteica, as proteínas Fn-tipo II (HSP-1 e HSP-2) detêm a maior concentração de proteínas do plasma seminal nos equinos, representando cerca de 70 a 80% das proteínas do plasma seminal (TOPFER-PETERSEN, et al., 2005; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005; MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, et al., 2011; GARCIA, et al., 2014, SILVEIRA, 2017).

1.4.1. Proteínas de baixo peso molecular

Nos equinos, até o momento foram isoladas e caracterizadas oito proteínas com peso molecular entre 14 a 30 kDa, denominadas proteínas do plasma seminal equino (HSP-1 a HSP-8 (TOPFER-PETERSEN et al., 2005), sendo a HSP-7 classificada como espermedesina (14–15 kDa) e encontrada em baixa concentração no sêmen dessa espécie (REINERT et al.; 1996; TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

A comparação proteômica do plasma seminal das espécies domésticas mais comuns evidencia padrões de bandas bastante distintos, e dentre as proteínas com maior variabilidade no plasma seminal, estão as espermedesinas (DRUART et al., 2013).

Essas proteínas são encontradas em vários animais domésticos, como suínos, bovinos, equinos e caprinos (TEDESCHI et al., 2000). Foram identificadas nos suínos (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II; SANZ et al., 1992; CALVETE et al., 1995), nos bovinos (aSFP e Z13; WEMPE et al., 1992; TEDESCHI et al.; 2000), nos ovinos (espermedesina de 15,5 kDa; BERGERON et al., 2005), no equino (HSP-7; REINERT et al., 1996), e mais recentemente em caprinos (BSFP e Bdh-1; Bdh-2; Bdh-3 e Bdh-4; TEIXEIRA et al., 2002; MELO et al., 2008), sendo o componente protéico majoritário no plasma seminal de ovinos (CONDESSA et al., 2017) e principalmente nos suínos, espécie na qual as espermedesinas representam mais de 90% das proteínas do plasma seminal (CALVETE et al., 1995 e TOPFER-PETERSEN et al., 1998). Já no sêmen dos equinos, as quantidades dessas proteínas de baixo peso molecular são bem menores que nas demais espécies domésticas (REINERT et al., 1996; TOPFER-PETERSEN et al., 2005; DRUART et al., 2013).

Wempe et al. (1992) e Schoneck et al. (1993) estão entre os primeiros a pressupor as características e funções das espermedesinas, estes, afirmaram que o papel fisiológico dessas proteínas estaria ligado ao processo de capacitação, reconhecimento e ligação entre o espermatozoide e o oócito. Villemure et al. (2003) e Jobim et al. (2003), inferiram que as

espermadesinas podem estar envolvidas na manutenção da motilidade espermática em caprinos e se ligam à membrana espermática durante o trânsito epididimário atuando na capacitação espermática. Souza et al. (2009); Silva et al. (2009) e Rodrigues et al. (2013) concordaram com essa interferência na motilidade promovida pelas espermadesinas. Corroborando com essas afirmações, Bergeron et al. (2005) avaliando o plasma seminal de ovinos, observou que a espermadesina teve atividade ligante a heparina, sugerindo que esta proteína apresenta um papel similar na capacitação espermática ou ligação do espermatozóide no epitélio ovidutal ou a zona pelúcida.

Analisando a proteômica do plasma seminal de ovinos, Rêgo (2010) e Soleilhavoup et al. (2014) observaram maior concentração para as proteínas pertencentes às famílias das BSPs e espermadesinas. Souza et al. (2012) também trabalhando com ovinos, observaram várias categorias de proteínas e concluíram que estas têm função potencial na proteção de espermatozoides, capacitação, reação acrossômica e interação espermatozoide-oócito. Avaliando os perfis proteômicos de carneiros de alta e baixa congelabilidade, Silva (2014) observou que proteínas como as espermadesinas foram mais expressas no carneiro de baixa congelabilidade, da mesma forma Goularte et al. (2014) e Rickard et al. (2015) correlacionaram vários marcadores proteômicos como responsáveis pela alta ou baixa resistência a congelação, esses últimos atribuíram aos marcadores positivos, não uma maior capacidade de congelação, mas sim a uma espermatogênese superior ou função testicular, resultando em espermatozoides mais robustos que são capazes de suportar a pressão da criopreservação.

Um trabalho recente de nosso grupo de pesquisa demonstrou que uma proteína de baixo peso molecular pertencente ao grupo das espermadesinas, pode desempenhar em ovinos, um papel importante na viabilidade dos espermatozoides, tanto na utilização de sêmen fresco, como congelado (CONDESSA et al., 2017).

1.4.2. Influência das proteínas seminais na congelação do sêmen equino

Em equinos, Reinert et al. (1996), Topfer-Petersen et al. (2005) afirmaram que a espermadesina equina (HSP-7) tem a capacidade de ligar-se a carboidratos da zona pelúcida, desempenhando assim um importante papel como molécula de adesão primária, nas etapas iniciais do processo de fecundação. Contudo, em equinos são escassos os

trabalhos que pesquisaram a relação dessas proteínas de baixo peso molecular com a fertilidade ou congelação do sêmen.

Estudos demonstram que a adição do plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade ao sêmen de garanhões de baixa congelabilidade resulta na resistência ao processo de congelação e descongelação e proporciona melhora da viabilidade espermática pós-descongelação (AURICH et al., 1996; FAGUNDES, 2003). O oposto também foi demonstrado ser verdadeiro, quando se adicionou sêmen de garanhão de baixa congelabilidade ao de animais com alta congelabilidade (AURICH et al., 1996).

Vários estudos apontam que a redução na proporção ou remoção do plasma seminal antes do resfriamento e da congelação promove melhora na motilidade espermática pós-descongelação (NISHIKAWA, 1975; JASKO et al., 1991; CROCKETT et al., 2001; VIDAMENT et al., 2000 e ALGHAMDI, et al., 2002).

Monteiro (2013) demonstrou em garanhões sub-férteis, que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, os quais consequentemente não tiveram contato prévio com secreções das glândulas acessórias, possuem maior qualidade e fertilidade quando comparados com o do ejaculado, demonstrando desta forma o efeito deletério das secreções das glândulas acessórias sobre a viabilidade espermática nestes animais.

Jobim et al. (2011) avaliando as proteínas do sêmen de garanhões de alta e baixa congelabilidade, verificaram diferenças no perfil protéico entre estes. Destacaram as proteínas CRISP-3 e HSP-2 como marcadores de alta congelabilidade e as proteínas da família HSP-1 associadas a baixa congelabilidade em equinos. Já Garcia et al. (2014), afirmaram que, tanto a HSP-1 quanto a HSP-2 estão relacionadas com a baixa fertilidade em garanhões.

Silveira (2017) estudando as proteínas do sêmen da raça Manga Larga Marchador, observou que as proteínas da família CRISP-3, HSP-1 e HSP-2 são possíveis candidatas a marcadores para a congelabilidade.

Fagundes (2003) observou que um "pool" de proteínas do plasma seminal de equinos, com peso superior a 10 kDa concentradas 10 vezes, adicionadas ao diluente antes da congelação, melhorou a motilidade após a descongelação. Contrariando esse resultado, Barreto (2007), avaliando o efeito de um "pool" de proteínas do plasma seminal equino com a massa superior a 10 kDa sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen, não percebeu melhora sobre os parâmetros espermáticos avaliados.

1.5. Cromatografia de filtração em gel segundo Nelson e Cox, (2014)

Para estudar as propriedades específicas das proteínas é necessário realizar a purificação delas, ou seja, separar uma proteína das outras. Para isso, existem vários métodos que são comumente utilizados. Os métodos mais eficientes para fracionar proteínas utilizam a cromatografia em coluna, técnica que se utiliza das diferentes propriedades das proteínas, principalmente as diferenças relacionadas ao tamanho, carga ou afinidade de ligação.

Na cromatografia em coluna (Figura R-1), um material sólido poroso com propriedades químicas adequadas (matriz) é apoiado no interior da coluna, que é geralmente feita de plástico ou vidro. A fase móvel (solução) flui através da matriz até sair da coluna, sendo constantemente substituída pela solução fornecida por um reservatório no topo. A solução de proteína a ser separada é colocada no topo da coluna e deixada percolar pela matriz sólida. Mais solução é adicionada no topo. A solução proteica forma uma banda no interior da fase móvel que tem inicialmente a profundidade da solução de proteína aplicada à coluna. À medida que as proteínas migram através da coluna, elas são retardadas em diferentes graus (maior rapidez ou lentidão) por suas diferentes interações com o material da matriz. A banda total de proteína, portanto, se amplia à medida que se move através da coluna. Tipos individuais de proteínas (como A, B e C, mostradas em azul, vermelho e verde no esquema abaixo) se separam gradualmente umas das outras, formando bandas no interior da banda proteica mais larga. A separação melhora à medida que o comprimento da coluna aumenta. Entretanto, cada banda proteica individual também se alarga com o tempo devido à dispersão por difusão, processo que diminui a resolução.

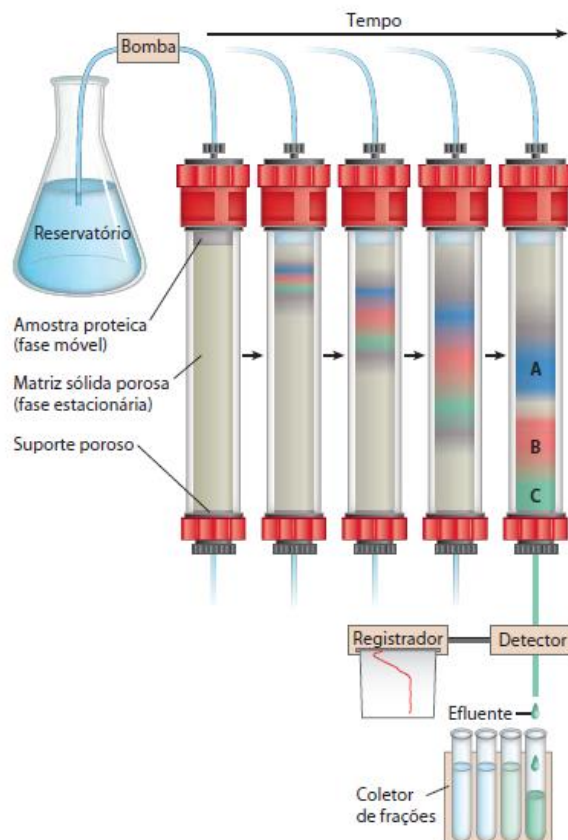


Figura R1. Esquema de cromatografia em coluna; A coluna cromatográfica é composta pela fase estacionária (matriz porosa) e pela fase móvel (solução). Além da coluna, no esquema é demonstrado o reservatório (contém a amostra a ser purificada), o detector, o registrador e o coletor das frações purificadas. Fonte: Nelson & Cox, 2014.

Dentre os tipos de cromatografia em coluna, a cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel, separa as proteínas de acordo com o tamanho. Neste método, as proteínas grandes emergem da coluna mais cedo do que as proteínas menores – resultado um tanto contrário ao esperado intuitivamente. A fase sólida consiste em grânulos de polímeros reticulados com poros ou cavidades projetados com um determinado tamanho. As proteínas grandes não podem entrar nas cavidades e, assim, tomam um caminho mais curto (e mais rápido) através da coluna, ao redor dos grânulos. Proteínas pequenas penetram nas cavidades e são retardadas em seu caminho de labirintos através da coluna, conforme demonstra a Figura R-2.

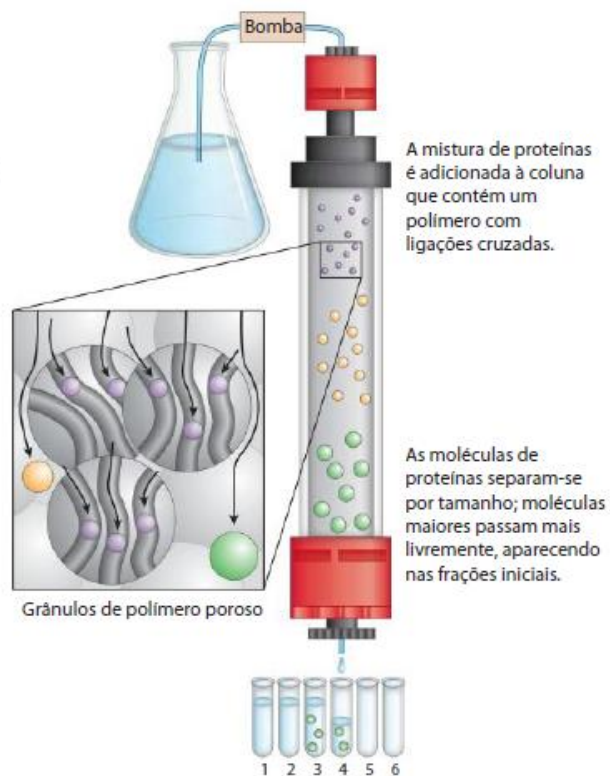


Figura R2. Cromatografia de exclusão por tamanho; A mistura de proteínas é adicionada à coluna que contém um polímero com ligações cruzadas. As moléculas de proteínas separam-se por tamanho, onde moléculas maiores passam mais livremente, aparecendo nas frações iniciais. Fonte: Nelson & Cox, 2014

1.6. Referências

- ALGHAMDI, A.S., TROEDSSON, M.H., XUE, J.L., CRABO, B.G.. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American journal of veterinary research*, v. 63, p. 880-885, 2002.
- ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., BURATINI, Jr. J. The effect of breeds spermatic parameters over equine semen freezability. In: *Symposium on Stallion Semen*, Amersfoort, Holanda, p.82, 1996.
- ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., NETO, C.R.. Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, v. 32, p. 521-530, 2016.
- ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., NETO, C.R. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.81-85, 2017.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v. 46, p. 791-797, 1996.
- AURICH, J., AURICH, C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction in domestic animals* 41, 275-279, 2006.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.268-275, 2008.
- AYRES, H., TORRES-JÚNIOR, J., PENTEADO, L., SOUZA, A., BARUSELLI, P. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. *Acta Scientiae Veterinariae* v.34, p.410, 2006.
- BARBACINI, S., LOOMIS, P., SQUIRES, E. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science* v.89, p.203-205, 2005.
- BARRETO, M. Efeitos das proteínas do plasma seminal eqüino com massa superior a 10 kda sobre a congelabilidade do sêmen, reação inflamatória uterina e fertilidade. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, Campo dos Goytacazes-RJ, 2007.
- BATELLIER F., VIDAMENT M., FAUQUANT J., DUCHAMP G., ARNAUD G., YVON J.M. & MAGISTRINI M. Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* v. 68, p.181-190, 2001.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*. v. 71, p. 461-470, 2005.
- BEZERRA, L.L. Análise bioquímica e proteômica do plasma seminal equino e sua relação com a criopreservação do sêmen. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa - UFV. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2015.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; DOSÀLOVÀ, Z.; TOPFER -PETERSEN, E. Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pelúcida binding. *Fertilita ĩ*. v.11: p.35-40, 1995.
- CANISSO, I.F.; SOUZA, A.F.; DA SILVA, E.C.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, A.L. Inseminação Artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, v. 6, n.3, p. 389-398, 2008.
- CARMO M.T. e ALMEIDA M.T. 2006. Biotecnologias da Reprodução aplicadas na criação de equinos. Disponível em <
http://www.abqm.com.br/2015/index.php?option=com_content&view=article&id=2977&catid=39&Itemid=124

- CARVALHO, G. Fertility of the Diluted Equine Semen, Cold to 20°C and Transported. Tese (Doutorado) - Departamento de Ciência Animal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 1992.
- CONDESSA, M.A.K.V., PIMENTEL, A.L., SEIXAS, F.A.V., MARTINEZ, A.C. Purification, structural and biophysical characterisation of the major seminal plasma protein from Texel rams. *Animal Reproduction Science*, v.189, p.11-18, 2017.
- CROCKETT, E. C., GRAHAM, J. K., BRUEMMER, J. E., SQUIRES, E. L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*, v.55, p.793-803, 2001.
- DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*, v.61, p. 7-17, 2003.
- DRUART, X., RICKARD, J., MACTIER, S., KOHNKE, P., KERSHAW-YOUNG, C., BATHGATE, R., GIBB, Z., CROSSETT, B., TSIKIS, G., LABAS, V. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of proteomics*, v.91, p.13-22, 2013.
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; GOHR, K.; WAGNER, A.; TSOLOVA, M.; PETRUNKINA, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in pig. *Biology of Reproduction*, v. 73, n. 3, p. 536-45, 2005.
- FAGUNDES, B. Análise do congelamento e descongelamento de sêmen equino utilizando proteínas do plasma seminal em diferentes concentrações. Dissertação (Mestrado em Produção animal -Área de Biotecnologia da Reprodução Animal) -Campos dos Goytacazes -RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense –UENF, 2003.
- FAO. FAOSTAT, Live Animals, Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. Live Animals, 2016.
- FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *American Society of Animal Science*, 2002.
- FUKUI, Y., KOHNO, H., TOGARI, T., HIWASA, M., OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.54, p.286-289, 2008.
- GARCIA, L.A.D.; BRITO, E.L.R.; SERPA, P.; GREGORY, J.; NATALINI, C.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M. Horse Seminal Plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility? *Pferdeheilkunde*, v.30, p.557-560, 2014.
- GIBB, Z., AITKEN, R.J. Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*. v.43, p.29-36, 2016.
- GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SÖDERQUIST, L. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.1157-1170, 2003.
- GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2. ed. Wisconsin: Equiservices: Madison, p.642, 1992.
- GOULARTE, K.L.; GASTAL, G.D.A.; SCHIAVON, R.S.; GONÇALVES, A.O.; SCHNEIDER, J.R.; CORCINI, C.D.; LUCIA JR, T. Association between the presence of protein bands in ram seminal plasma and sperm tolerance to freezing. *Animal Reproduction Science*, v.146, p.165-169, 2014.
- GOMES, G., JACOB, J., MEDEIROS, A., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, p.277-279, 2002.

- GOMES, G., GOMES, L. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, p. 210-215, 2009.
- HARTWIG, F., LISBOA, F., MONTEIRO, G., MAZIERO, R., FREITAS-DELL'AQUA, C., ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., DELL'AQUA, J. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* 81, 340-346, 2014.
- HIWASA, M., KOHNO, H., TOGARI, T., OKABE, K., FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.55, p.50-54, 2009.
- HOFFMANN, N., OLDENHOF, H., MORANDINI, C., ROHN, K., SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science* v.125, p.112-118, 2011.
- IVANOFF, E. I. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *J. Agric. Sci.* 12: p.244-256, 1922.
- JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v. 35, n. 5, p. 1059-1067, 1991.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; MATTOS, R.C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.21-30, 2003.
- JOBIM, M. I. M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R. M.; SIEME, H.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.76, n.4, p.765-771, 2011.
- KARESKOSKI M., KATILA T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci*, v.107: p.249-56, 2008.
- LEAHY, T. e GRAAF, S.P. Seminal Plasma and its Effect on Ruminant Spermatozoa During Processing. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.207-213, 2012
- LIMA, R.A.S., CINTRA, A.G. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, 56, 2016.
- LOOMIS, P. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.191-200, 2001.
- LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, v.22, p.663-676, 2006.
- LOOMIS PR, GRAHAM JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.119-128, 2008.
- MANN, T. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Methuen and Co Ltd, London, 1964.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Equídeos. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>.
- MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; HAVT, A.; CUNHA, R.M.; MARTINS, D.B.G.; CASTELLETTI, C.H.M.; SOUZA, P.R.E.; FILHO, J.L.L.; FREITAS, V.J.F.; CAVADA, B.S.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Mol. Reprod. Dev.* v.75, p.8-16, 2008.
- MILLER, C. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, p.70, p.463-468, 2008.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA M, KORDAN W. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Pol J Vet Sci*, p.489–499, 2011.

MONTEIRO GA. Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis. 120f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Estado de São Paulo, Botucatu, 2013.

NATH, L., ANDERSON, G., MCKINNON, A. Reproductive efficiency of Thoroughbred and Standardbred horses in north - east Victoria. *Australian veterinary journal*, v.88, p.169-175, 2010.

NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M.; MIRAGAYA, M.H.; GONZALES, E.; AGUERO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *First International Journal of Andrology*, v.32, p.351-355, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6º ed. Porto Alegre: Artmed, p.89-92. 2014.

NISHIKAWA, Y. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. *J. Reprod. Fertil.*, v.23, suppl., p.99-104, 1975.

PAPA, F., MELO, C., DELL'AQUA, J., MACEDO, L., CARVALHO, A., ALVARENGA, M., MEDEIROS, A. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Sci Vet*, v.33, p.19-27, 2005.

PARADIS, M. Demographics of health and disease in the geriatric horse. *Veterinary Clinics of North America -Equine Practice*, p.391–401, 2002.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: Mckinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, p.769-789, 1993.

POLGE, C., SMITH, A. U., PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (Lond.)* 164:666, 1949.

RAMIRES NETO, PAPA FO, ALVARENGA MA. Plasma membrane lipid profile from resistant and sensitive spermatozoa of Mangalarga Marchador stallions after cooling at 5°C. *J Equine Vet Sci*, v.43, p.76-77, 2016.

RÊGO, J.P.A. Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal do Ceará - Centro de ciências agrárias departamento de zootecnia - Programa de pós-graduação em zootecnia. 106p, 2010.

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

RICKARD, J.P.; LEAHY, T.; SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; LYNCH, G.W.; DRUART, X.; DE GRAAF, S.P. The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 2015

RODRIGUES, M.A.M.; SOUZA, C.E.A.; MARTINS, J.A.M.; REGO, J.P.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.; NOGUEIRA, F.C.S.; MOURA, A.A. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. *Small Ruminant Research*, v.109, p.94-100, 2013.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; FRANCESCHINI, P. H.; ESPER, C. R. Sperm membrane and seminal plasma 2D protein profiles and their relation with bull's fertility. In: 15th International Congress on Animal Reproduction. Proceedings p.187, 2004.

SÁ FILHO, M., TORRES-JÚNIOR, J., PENTEADO, L., GIMENES, L., FERREIRA, R., AYRES, H., E PAULA, L.C., SALES, J., BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin improves the

efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.182-187, 2010.

SAMPER, J., PYCOCK, J., MCKINNON, A. Insemination with Frozen Semen: Some Management Considerations for Stallions, In: Samper, J., McKinnon, A. (Eds.), *Current Therapy in Equine Reproduction*, Elsevier-Sounders, p.285-288, 2006.

SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; SHCAFER, W.; SCHIMID, E.R.; AMSELGRUBER, W.; SINOWATS, F.; EHRHARD, M.; TOPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Lett*, v.300, p.213-218, 1992.

SCHONECK, C.; EINSPANIER, R.; SCHALLENRGER, E.; SCHAMS, D. Effects of the bovine seminal protein aSFP: protection of spermatozoa and rapid uptake by the female mucosa. *J. Reprod. Fertil.* v.12, p. 21-31, 1993.

SCHUTZER A. G. C. Utilização do implante de progesterona intra-vaginal e acetato de deslorelina em éguas acíclicas associados ou não a luz artificial para o controle da sazonalidade reprodutiva. 2012. (Dissertação). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2012.

SILVA, N.M.M.; ELOY, A.M.X.; FURTADO, J.R.; SOUSA, A.Z.B.; SILVA, N.M. Avaliação do Sêmen fresco e pós-congelado de ovinos da raça morada nova na região semi árida do nordeste. *Embrapa Caprinos e Ovinos – CNPC*, 2009.

SILVA, T.A.S.N. Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Programa de Pós Graduação em Ciências Animais. 77p, 2014.

SILVEIRA, C.O. Formas de CRISP-3, HSP-1 e HSP-2 como candidatas a marcadores de congelabilidade do sêmen de garanhões da raça mangalarga marchador. 2017. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2017.

SOARES, Tiago. 2015. O mercado da equinocultura no Brasil. Disponível em: <<https://meiorural.com.br/noticia/?nn=825&n=o-mercado-da-equinocultura-no-brasil>>.

SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; KOHNKE, P.L.; DACHEUX, J.L.; GUÉRIN, Y.; GATTI, J.L.; de GRAAF, S.P.; DRUART, X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Journal of Proteomics*, v 109, p.245-260, 2014.

SOUZA, G.V. Criopreservação De Sêmen Equino: Desenvolvimento de equipamentos para congelamento em aceleração e para descongelamento ultra-rápido (98°C/4seg). 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, 2006.

SOUZA, A.F.; LEITÃO, M.C.G.; BATISTA, A.M.; PORTO, A.L.F.; FILHO, J.L.L.; GUERRA, M.M.P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionados com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. *Ciência Rural*, v.39, n.4, p.1166-1172, 2009.

SOUZA, C.E.A.; REGO, J.P.A.; LOBO, C.H.; OLIVEIRA, J.T.; NOGUEIRA, F.C.S.; DOMONT, G.B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F.C.; MORENO, F.B.; MONTEIRO MOREIRA, A.C.O.; FIGUEIREDO, J.R.; MOURA, A.A. P. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of Proteomics*, v 75, p. 4436-4456, 2012.

TEDESCHI, F.; OUNGRE, E.; MONTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem*, v.267, p.6175-6179, 2000.

TEIXEIRA, D.I.A.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H.; HAVT, A.; BLOCH, J.C.; PRATES, M.V.; MORENO, F.B.M.B.; SANTOS, E.A.; GADELHA, C.A.A.; GADELHA, T.S.; CRISOSTOMO, F.S.M.; FREITAS, V.J. Isolation and partial characterisation of a protein from

buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. *Prot. Pep. Lett.*9: p.331-335, 2002.

TERRACIANO, P.B. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.37, p.109-110, 2009.

TOPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; DOSTALOVA, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v.30, p.217-224, 1998.

TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.159-170, 2005.

VIDAMENT, M., ECOT, P., NOUE, P., BOURGEOIS, C., MAGISTRINI, M., PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.907-919, 2000.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol*, v1, p.39, 2003

WATSON, P. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.481-492, 2000.

WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K.H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal protein. *Biochem Biophys Res Commun*, v.183, p.232-237, 1992.

PARTE II - ARTIGO CIENTÍFICO

**EFEITO DA ADIÇÃO DE FRAÇÕES PROTEICAS DO PLASMA SEMINAL DE
OVINOS NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO PÓS
DESCONGELAÇÃO**

Maycon Araújo Ruivo¹, Tainá Michelle da Cruz², Antônio Campanha Martinez¹, Flavio Augusto Vicente Seixas^{2*}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Maringá - UEM, Umuarama, Paraná, Brasil.

² Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá - UEM, Umuarama, Paraná, Brasil.

* Autor de correspondência
favseixas@uem.br
Av. Ângelo Moreira da Fonseca, 1800
87506-370, Umuarama, PR, Brazil.

Resumo

As taxas de prenhez com sêmen congelado de ovinos são superiores as de equinos. A composição das proteínas de baixa massa molecular do plasma seminal de ovinos é apontada como um dos fatores que influenciam positivamente neste efeito, pois nos equinos, as quantidades destas proteínas são bem menores. Esse projeto teve por objetivo purificar as proteínas de baixa massa molecular existentes no plasma seminal de ovinos e utiliza-las como adjuvante ao diluente do sêmen equino antes da congelação, no intuito de avaliar a possível melhoria da viabilidade espermática. Para isso, amostras de sêmen de carneiros foram coletadas e o plasma separado por centrifugação. As frações protéicas foram purificadas por técnicas de cromatografia de filtração em gel. O sêmen descongelado foi avaliado por meio do sistema computadorizado CASA. Como resultado, duas frações proteicas com massa molecular de 13 e 15 kDa foram isoladas, concentradas e misturadas ao sêmen equino fresco na proporção de 0, 1× e 2×, sendo imediatamente congeladas. As amostras permaneceram congeladas em N₂ líquido até o uso. Após a descongelação, as análises mostraram que a adição da fração 2, de proteínas com 13 kDa, promoveu efeito inibitório significativo sobre a motilidade e vigor, enquanto que a adição da fração 3, com proteínas de 15 kDa, promoveu melhora expressiva no vigor sem afetar a motilidade. Diferentes frações de proteínas do plasma seminal podem ter efeitos distintos sobre a viabilidade dos espermatozóides de maneira dependente da concentração.

Palavras-chave: Carneiro, cavalo, proteoma, reprodução animal.

Introdução

A equinocultura é um segmento agropecuário de grande importância econômica em diversos países do mundo. No Brasil, dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mostram que a indústria de equinos cresceu quase 12% ao ano nos últimos 10 anos (Lima and Cintra, 2016) . Em 2006 eram 7,5 bilhões de faturamento bruto anual, e em 2015 foram 16 bilhões de reais. Este segmento promove a geração de aproximadamente 610 mil empregos diretos e 2.430 milhões de empregos indiretos, sendo responsável por três milhões de vagas de trabalho (Lima and Cintra, 2016).

Segundo estimativa da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), mais de 50% dos equinos de todo o mundo se encontram nas Américas, sendo os Estados Unidos o país com maior número de animais. O Brasil se encontra na quarta posição, com mais de cinco milhões de equinos em seu território, sendo que no mundo todo existem mais de 50 milhões de animais dessa espécie (FAO, 2016).

Um dos fatores importantes que contribuíram para essa expansão do mercado dos equinos foi a utilização e otimização das biotecnologias aplicadas a reprodução, pois estas proporcionam a obtenção de um maior número de animais melhorados geneticamente, num espaço de tempo menor (Gomes and Gomes, 2009). Uma das biotecnologias da reprodução mais utilizada em equinos é a inseminação artificial, que pode ser realizada por meio de sêmen *in natura* diluído, diluído-transportado, diluído-resfriado-transportado, além do congelado (Carvalho, 1992), sendo que o método mais empregado nos equinos é o de sêmen resfriado (Loomis, 2006). Contudo, durante muito tempo, o uso da inseminação artificial em equinos foi restrito devido a não aprovação por parte das associações de raças (Samper et al., 2006). Após a aceitação do registro de animais gerados a partir do uso de biotecnologias por parte de várias associações, foi que houve uma maior difusão das técnicas em todo o mundo (Papa et al., 2005).

Em muitos países europeus, grande parte das éguas destinadas a reprodução são inseminadas, sendo a maioria destas inseminações realizada por meio de sêmen resfriado (Aurich and Aurich, 2006). Na Austrália, por exemplo, 90% dos potros da raça Standardbred são oriundos de inseminação com sêmen congelado ou resfriado (Nath et al., 2010), enquanto que no Brasil, aproximadamente 20% das éguas doadoras de embriões foram geradas a partir de sêmen congelado (Alvarenga et al., 2016).

A inseminação artificial com uso de sêmen congelado proporciona inúmeras vantagens, como propagação rápida do DNA de um ganhão de alto valor genético, uso do sêmen mesmo após o óbito do animal, prevenção do risco de doenças, e principalmente a estocagem, pois, permite o uso do sêmen em longas distâncias, sem a necessidade de tempo pré-determinado para se realizar a inseminação após a colheita do sêmen (Miller, 2008; Alvarenga et al., 2016).

O uso do sêmen congelado em equinos tem vários pontos positivos, entretanto, de forma geral, os índices obtidos são muito inferiores quando comparados ao sêmen fresco ou refrigerado (Watson, 2000; Terraciano, 2009). Além disso, há uma diferença muito grande entre ganhões, no que diz respeito ao processo de criopreservação, pois alguns têm boa qualidade pós-descongelamento e outros não (Gomes et al., 2002; Hartwig et al., 2014).

O sucesso da técnica de inseminação artificial com sêmen congelado ocorre em algumas espécies, como é o caso dos bovinos e ovinos. Vários são os estudos que demonstram o êxito da utilização da técnica de inseminação artificial usando o sêmen congelado nos bovinos, onde as taxas de prenhez observadas comumente giram entre 40 e 70% (Ayres et al., 2006; Sá Filho et al., 2010), bem como em ovinos, onde taxa de prenhez também está entre 40 e 70% (Gil et al., 2003; Fukui et al., 2008; Hiwasa et al., 2009). Em ambas as espécies (bovinos e ovinos), os índices obtidos na inseminação artificial com uso de sêmen congelado são satisfatórios, já nos equinos, estes índices são muito variáveis, oscilando geralmente entre 25 e 50% (Barbacini et al., 2005; Hoffmann et al., 2011).

A comparação proteômica do plasma seminal das espécies domésticas mais comuns evidenciou perfis proteicos bastante distintos. Isso se deve principalmente a diferenças na contribuição relativa das glândulas sexuais acessórias (Druart et al., 2013). Dentre as proteínas com maior variabilidade no plasma seminal das espécies unguladas, as proteínas de baixa massa molecular (14–15 kDa) estão em alta concentração, sendo o componente protéico majoritário no plasma seminal de ovinos (Condessa et al., 2017) e nos suínos (Calvete et al., 1995; Töpfer - Petersen et al., 1998). Já no sêmen dos equinos, as quantidades dessas proteínas de baixa massa molecular são bem menores que nas demais espécies domésticas (Reinert et al., 1996; Druart et al., 2013). Um trabalho recente demonstrou que uma proteína de baixa massa molecular pertencente ao grupo das espermedesinas, pode desempenhar em ovinos, um papel importante na viabilidade dos

espermatozoides, tanto na utilização de sêmen fresco, como congelado (Condessa et al., 2017).

É notório que, de modo geral, a qualidade do sêmen equino se torna muito inferior após a congelação, o que diminui a taxa de prenhez ao utilizar sêmen descongelado dessa espécie. Por outro lado, o sêmen ovino tem uma congelabilidade considerada muito boa quando comparada à do equino. Partindo deste princípio, esse projeto teve por objetivo purificar as proteínas com baixa massa molecular existentes no plasma seminal de ovinos, e utiliza-las como adjuvante ao diluente do sêmen equino antes deste ser congelado. A hipótese que norteia esse projeto é a possível melhoria da viabilidade espermática do sêmen equino após receber suplementação com proteínas seminais ovinas de baixa massa molecular antes do processo de congelação.

Material e Métodos

Coleta do sêmen

Dezesseis carneiros da raça Dorper com aproximadamente doze meses de idade, foram utilizados para coleta de sêmen por meio de eletroejaculação, sendo utilizado o sêmen de 14 destes. O plasma seminal foi separado por centrifugação a 670 g por 10 minutos em centrífuga clínica (Metroterm) e, em seguida misturados para formar um *pool* plasmático. Foi adicionado a esta mistura, 5 μ L de inibidor de protease P9599 (Sigma) para evitar degradação da amostra.

O sêmen equino foi coletado por meio de vagina artificial modelo Botucatu, de um único animal da raça quarto de milha, de cinco anos de idade, que atendeu às normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Esse animal selecionado era pertencente a uma Central de Coleta de Sêmen do município de Umuarama, Paraná, e estava em rotina de coleta de sêmen.

Purificação das proteínas

Um volume de 200 μ L de plasma seminal ovino foi inserido em uma coluna cromatográfica de 27 \times 1,5 cm (altura \times diâmetro) contendo resina Sephadex G25 (GE Life Sciences) equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 num fluxo de 1,4 mL.min⁻¹. A eluição da amostra foi monitorada em 214 nm em um espectrofotômetro UV-Vis

(Shimadzu UV-1650PC). Os picos de eluição correspondentes as diferentes proteínas foram coletados separadamente e concentrados em concentradores Amicon 10.000 MWCO (Millipore) a 4 °C. A fração eluída que continha as proteínas de interesse foi concentrada até 100 µL e inserida em outra coluna cromatográfica de 51 × 1,5 cm (altura × diâmetro) contendo resina Sephacryl S200 (GE Life Sciences) equilibrada com o mesmo tampão no mesmo fluxo de eluição, passando várias vezes para não saturar a coluna. A pureza das amostras e o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal ovino foram obtidos por meio de SDS-PAGE a 15% corada com nitrato de prata (Laemmli, 1970). As proteínas foram dosadas pelo método de Biureto por meio de kit diagnóstico da Gold Analyza®. Ao final, as proteínas de interesse foram congeladas a -20 °C até o momento do uso.

Congelação do sêmen equino

Foi utilizado o método de congelação de sêmen equino proposto por (Kneissl, 1993), onde, primeiro realiza-se a refrigeração, e posteriormente a congelação em nitrogênio líquido. Para isso, o sêmen total coletado foi avaliado quanto à motilidade e vigor, bem como, foi feita a avaliação da concentração espermática com a Câmara de Neubauer. Todos os parâmetros avaliados estavam de acordo com os padrões mínimos descritos pelo CBRA. Após a coleta, o sêmen foi acrescido de diluente para transporte (Botusêmen/Botupharma®). Em seguida foi centrifugado a 670 g por 10 min. O plasma seminal (sobrenadante) foi descartado. O volume do precipitado foi de aproximadamente 3.750 µL e, a ele foi adicionado o diluente comercial para congelação de sêmen equino (Botucio, Botupharma®), na proporção de 1:1, totalizando 7.500 µL. Esta solução foi dividida em cinco microtubos com 1500 µL cada. A proporção de proteína adicionada no sêmen seguiu a regra de 0 (controle), 1× e 2×. Para isso, no primeiro microtubo nada de proteína foi adicionada (controle). No segundo microtubo foi adicionado 40 µL da fração isolada 2 (1xP2), e em outro microtubo foi adicionado 80 µL da fração isolada 2 (2xP2). No quarto microtubo foi acrescentado 70 µL da fração isolada 3 (1xP3) e, no último microtubo foi adicionado 140 µL desta mesma fração (2xP3). Cada uma das soluções dos microtubos foi envasada em seis palhetas de 250 µL cada, ficando com aproximadamente 20 milhões de espermatozoides viáveis em cada palheta. Em seguida, as palhetas foram refrigeradas a 5 °C por 20 min. Após a refrigeração, as palhetas foram expostas ao vapor do nitrogênio líquido na posição horizontal, a uma distância de 4 cm da superfície do

líquido por 15 min. Após este procedimento, todas as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido de maneira simultânea e, em seguida armazenadas em botijão criogênico na presença de nitrogênio líquido.

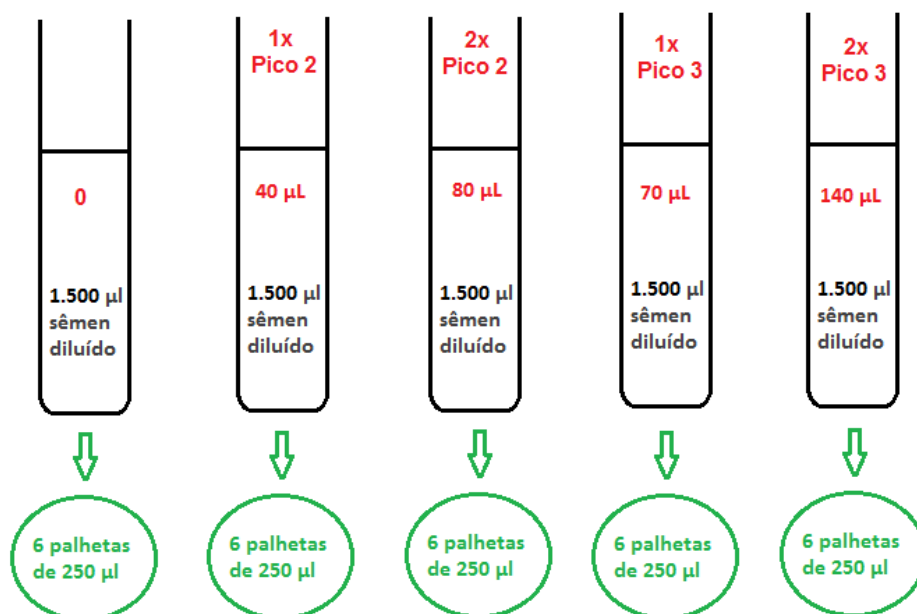


Figura 01. Design experimental ilustrando as concentrações das frações protéicas nos diferentes grupos/tubos tratados.

Análise da viabilidade espermática pós-descongelção

Para as avaliações seminais pós descongelção foi usado o sistema automatizado CASA (Computer Assisted Sêmen Analysis), software AndroVision® (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha), que visualiza, digitaliza e analisa sucessivas imagens dos espermatozoides, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos sumarizados da população global (Quintero-Moreno et al., 2003).

Cada amostra de sêmen foi retirada do botijão criogênico e descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos. Logo após a descongelção, foi adicionada uma amostra de 10 µL de sêmen de cada palheta para avaliação no CASA. Uma câmara de leitura (Leja® standard count, SC20.01.FA, 20 micron) foi utilizada, e através do microscópio e do sistema computadorizado, três campos distintos de cada amostra foram registrados e avaliados automaticamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados pelo sistema: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), velocidade retilínea (VSL; µm/s), velocidade de trajeto (VAP; µm/s), distância

curvilínea (DCL; μm), distância em linha reta (DSL; μm), distância percorrida do trajeto médio (DAP; μm), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos de cauda (BCF; Hz), coeficiente de oscilação (WOB), linearidade (LIN) e retilinearidade (Arruda, 2000).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Origin 6.0 por meio do teste *t* com nível de significância de 5%.

Comitê de Ética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob protocolo nº 2253120516, em atendimento à Lei 11794/2008.

Resultados e Discussão

Purificação das proteínas do plasma seminal ovino

Optamos por purificar as proteínas de baixo peso molecular (entre 13 e 15 kDa) do sêmen dos ovinos, devido à alta expressão desse tipo de proteínas nessa espécie, somado ao fato de que nos equinos a concentração é baixa.

Foram coletados em torno de 500 μL de sêmen de cada carneiro onde, após a separação do plasma por centrifugação, as amostras foram misturadas para formar um *pool* plasmático. As frações de proteínas presentes nesta mistura estão mostradas na figura 02.

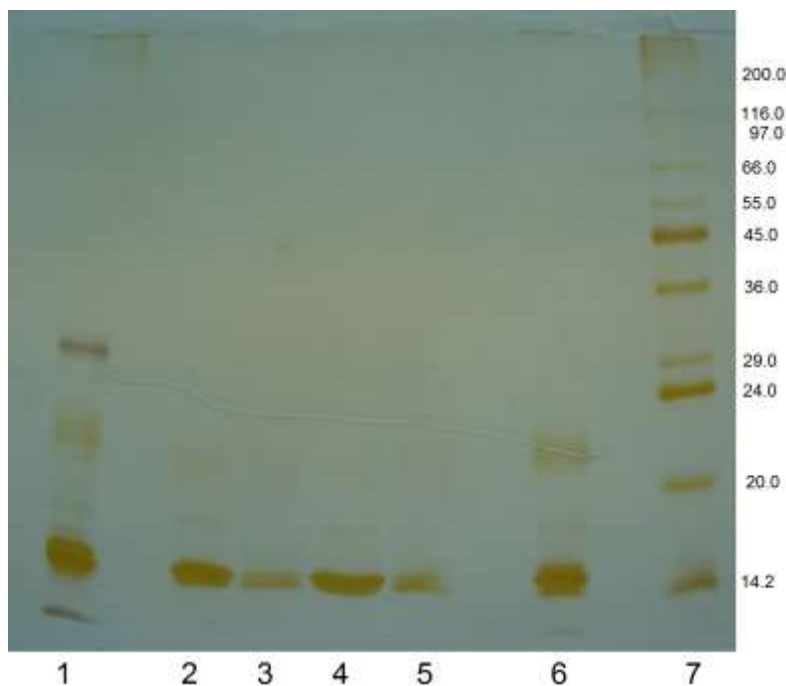


Figura 02. Gel SDS-PAGE a 15% mostrando as proteínas do plasma seminal de ovinos. Os poços 1 e 6 mostram as frações totais do plasma seminal em 2 diferentes concentrações. Os poços 2 e 4 mostram a banda correspondente ao pico 2 da figura 03B. Os poços 3 e 5 mostram a banda correspondente ao pico 3 da figura 03B. O poço 7 mostra o marcador Sigma Marker wide range S8445.

Os componentes majoritários do plasma seminal de carneiros da raça Dorper correspondem a duas proteínas de massa molecular entre 13 e 15 kDa (figura 02), semelhante ao observado em carneiros da raça Texel (Condessa et al., 2017), pertencentes ao grupo das espermadecinas e das proteínas que contêm domínios de fibronectina de tipo II (Bergeron et al., 2005).

A separação das proteínas do plasma seminal ocorreu inicialmente por filtração em gel de Sephadex G25 (figura 03A). Esta etapa tinha por objetivo separar as proteínas dos componentes não protéicos da amostra. Para isso, uma alíquota de 200 μ L de plasma seminal foi inserida na coluna. A eluição correspondente ao pico com as proteínas foi identificada por SDS-PAGE e concentrado até 100 μ L para ser inserido na segunda coluna contendo gel Sephacryl S200 (Figura 03B) onde ocorreu separação dos diferentes componentes protéicos.

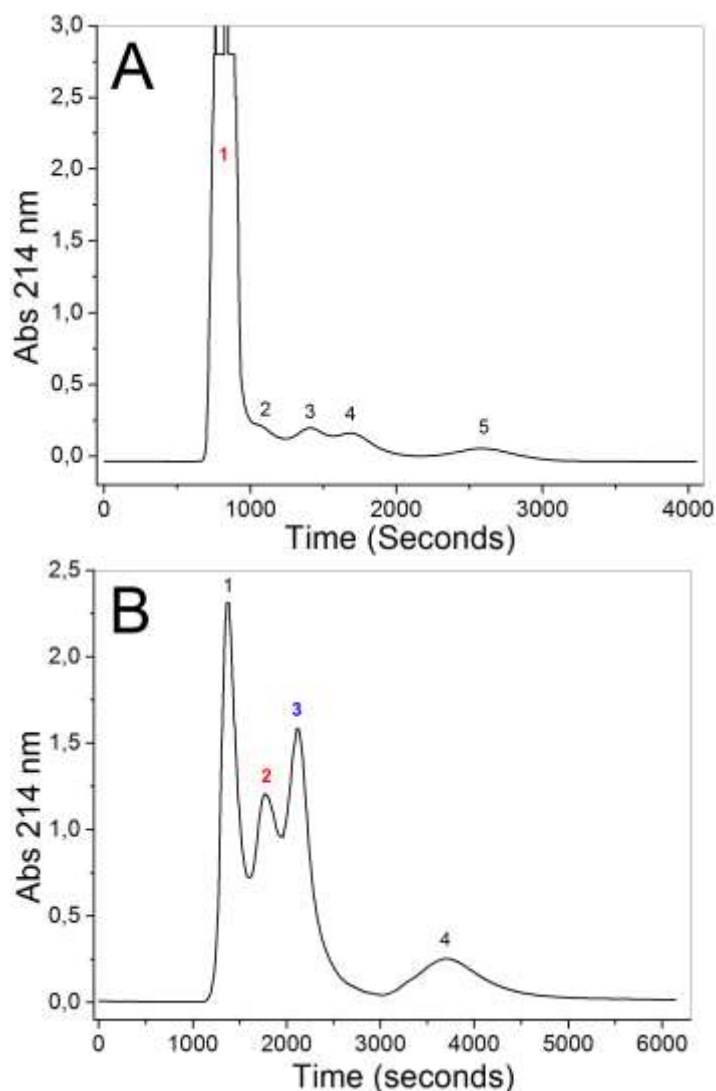


Figura 03. (A) Perfil de eluição do plasma seminal em gel de Sephadex G25. O pico 1 que continha as proteínas seminais foi concentrado e inserido na segunda coluna. (B) Perfil de eluição das proteínas do plasma seminal em gel de Sephacryl S200. Os picos 2 (fração 2) e 3 (fração 3) correspondem às proteínas com massa molecular próxima de 15 kDa.

As proteínas correspondentes aos picos 2 e 3 da figura 03B foram coletadas separadamente e, de acordo com SDS-PAGE (figura 02), correspondem as frações proteicas com massa molecular próxima de 13 kDa (fração 2, proteínas 2) e de 15 kDa (fração 3, proteínas 3). O pico 4 da figura 03B continha uma fração protéica com aproximadamente 7 kDa, portanto, não pôde ser aproveitada pois, devido ao limite de corte da membrana do concentrador, somente proteínas maiores que 10 kDa podiam ser concentradas. O pico 1 da figura 03B continha todas as frações protéicas com massa molecular superior a 16 kDa, e essas proteínas não foram utilizadas nos ensaios.

É interessante notar que proteínas com 13 e 15 kDa seriam praticamente inseparáveis pelo método de filtração em gel, devido à massa molecular muito próxima. Contudo, uma vez que as condições de extração não foram desnaturantes, e que as proteínas maiores tendem a eluir primeiro na coluna de filtração em gel, torna-se evidente que as proteínas contidas na fração 2 se associem para formar unidades oligoméricas maiores como dímeros ou tetrâmeros na sua unidade biológica (funcional), o que lhe conferiu massa molecular maior, permitindo sua separação.

Após concentradas, a dosagem do teor de proteínas mostrou que a fração 2 continha $0,64 \text{ g.dL}^{-1}$ e a fração 3 continha $0,46 \text{ g.dL}^{-1}$ ($6,4$ e $4,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente).

Criopreservação do sêmen equino tratado

O fato de ter sido adicionado diluente para transporte ao sêmen, e este ter sido centrifugado para remoção do sobrenadante, fez com que grande parte das proteínas do plasma seminal fosse removida neste processo. A adição do diluente para congelação diluiu ainda mais o pequeno teor de proteínas do sêmen que poderiam ter ficado. O baixíssimo teor das proteínas plasmáticas remanescentes na amostra seminal contribuiu para que do efeito isolado das proteínas que foram adicionadas se tornasse mais destacado.

Após a adição das proteínas de carneiro, o teor acrescido de proteínas nas amostras foi de $0,017 \text{ g.dL}^{-1}$ no tubo $1 \times P2$, de $0,034 \text{ g.dL}^{-1}$ no tubo $2 \times P2$, de $0,021 \text{ g.dL}^{-1}$ no tubo $1 \times P3$ e de $0,042 \text{ g.dL}^{-1}$ no tubo $2 \times P3$. Em seguida, as amostras de sêmen equino tratadas foram congeladas no dia 13 de novembro de 2017 e foram estocadas em botijão criogênico juntamente com a amostra controle sem tratamento e, descongeladas para análises no dia 18 de dezembro de 2017, ficando congeladas por trinta e cinco dias.

As análises dos parâmetros da viabilidade espermática para o sêmen descongelado acrescido da fração 2 estão representadas na figura 04. Considerando uma margem de erro de 5%, não foram observadas mudanças significativas na maioria dos parâmetros avaliados, embora uma tendência significativa à diminuição da motilidade total e da motilidade progressiva seja observada (tabela 01).

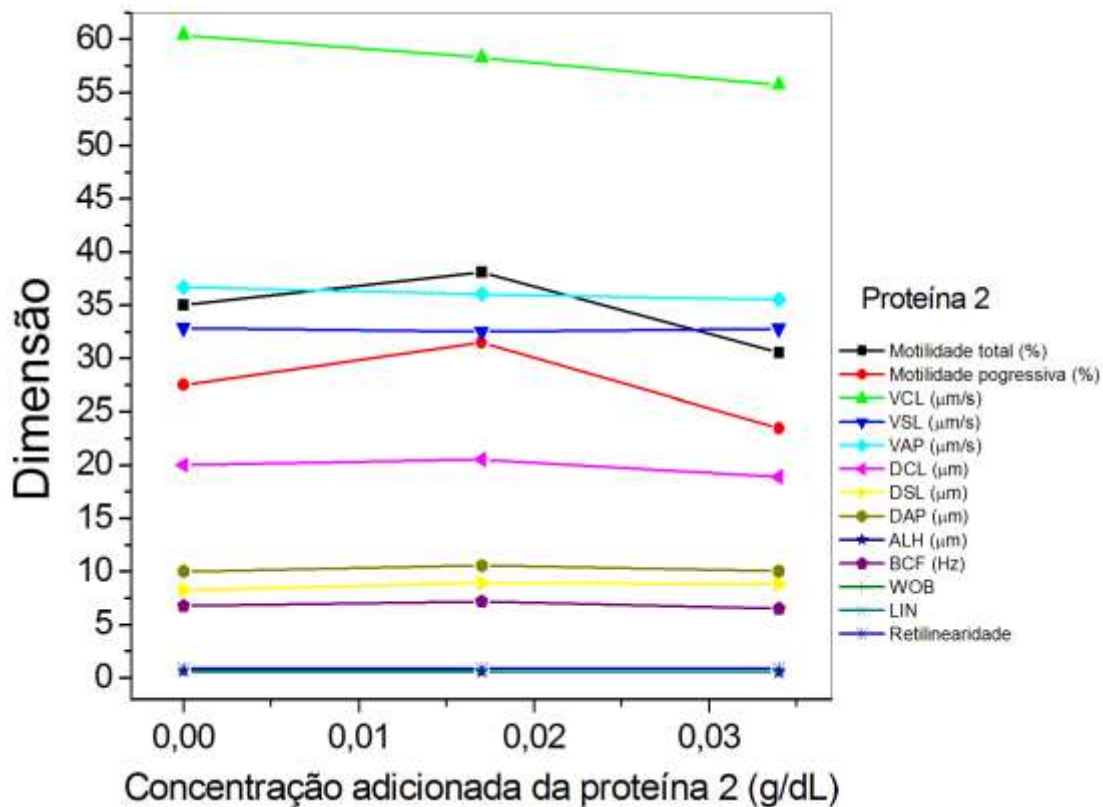


Figura 04. Parâmetros da viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas da fração 2. Cada ponto no gráfico representa a média de avaliações de cinco palhetas descongeladas.

A tabela 01 mostra os valores obtidos para cada parâmetro avaliado pelo CASA em cada uma das condições tratadas, acrescidas da fração 2. Dos 13 parâmetros avaliados, dez pioraram, sendo cinco de forma significativa ($p > 0,05$). Em função destes resultados, concluímos que a adição da fração 2, que tem massa molecular menor (~ 13 kDa) levou a uma piora na viabilidade espermática pós-descongelação.

Tabela 01. Valores obtidos dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das concentrações testadas (negrito) para o sêmen tratado com a fração 2. A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição variou em relação ao controle. Valores positivos indicam melhora enquanto que valores negativos indicam piora na condição.

| Parâmetro | Condição/Tratamentos | | | | |
|-----------------------------|----------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | 0 | 1× | % relativa | 2× | % Relativa |
| Motilidade Total (%) | 35,01 | 38,10 | 8,83 | 30,53 | -12,80 |
| Mot. Progressiva (%) | 27,50 | 31,50 | 14,54 | 23,49 | -14,57 |
| VCL (µm/s) | 60,44 | 58,29 | -3,56 | 55,76 | -7,75 |
| VSL (µm/s) | 32,85 | 32,53 | -0,98 | 32,80 | -0,17 |
| VAP (µm/s) | 36,72 | 36,04 | -1,86 | 35,55 | -3,20 |
| DCL (µm) | 20,04 | 20,56 | 2,62 | 18,91 | -5,62 |
| DSL (µm) | 8,26 | 8,94 | 8,18 | 8,82 | 6,78 |
| DAP (µm) | 10,03 | 10,57 | 5,34 | 10,04 | 0,08 |
| ALH (µm) | 0,66 | 0,60 | -8,61 | 0,57 | -13,90 |
| BCF (Hz) | 6,79 | 7,20 | 6,04 | 6,53 | -3,83 |
| WOB | 0,60 | 0,60 | -0,66 | 0,59 | -2,98 |
| LIN | 0,54 | 0,54 | 0,00 | 0,53 | -2,22 |
| Retilinearidade | 0,88 | 0,90 | 1,47 | 0,90 | 1,81 |

Ao considerar a motilidade, observa-se pelos dados da figura 04 e da tabela 01, que a adição da fração 2 em baixa concentração (1×) promoveu uma pequena melhora. Porém, ao acrescentar o dobro de sua concentração (2×), o resultado foi uma perda muito maior na motilidade. Os parâmetros relacionados à velocidade dos espermatozoides (VCL, VSL e VAP) também apresentaram uma tendência de piora. O único parâmetro em que foi observada melhora significativa nas duas concentrações da adição da fração 2 foi o DSL, porém, não observamos relevância neste parâmetro de forma isolada. Deste modo, concluímos que adições da fração 2 de proteínas levou a uma piora na viabilidade espermática.

A figura 05 representa a avaliação da viabilidade espermática para o sêmen descongelado que recebeu a fração 3. Os parâmetros motilidade total e motilidade progressiva não sofreram alterações nas duas concentrações testadas. Contudo, os parâmetros velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL) e velocidade do trajeto (VAP) foram significativamente superiores em função do aumento da concentração da fração 3, em relação ao grupo controle. Os demais parâmetros permaneceram praticamente inalterados com os tratamentos.

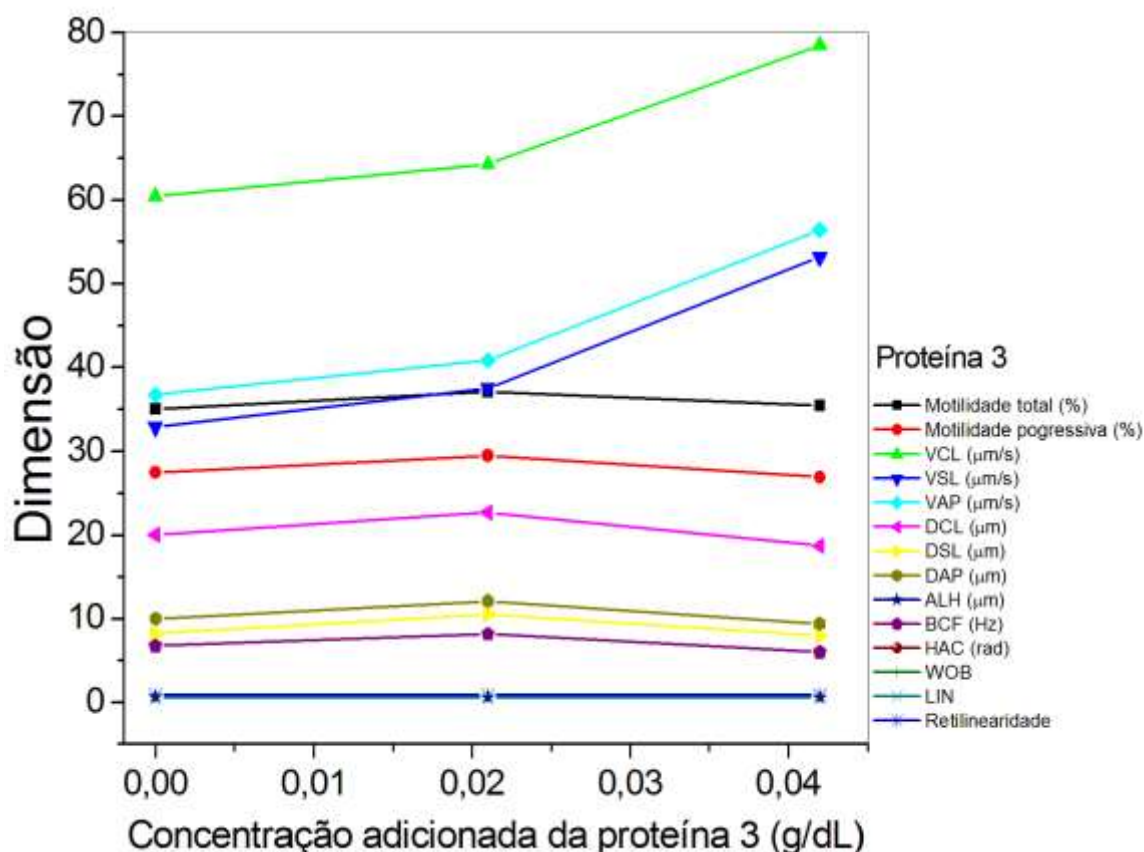


Figura 05. Parâmetros da viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três condições avaliadas da fração 3. Cada ponto no gráfico representa a média de cinco avaliações (palhetas descongeladas).

A tabela 02, apresenta os dados da viabilidade espermática obtido pelo CASA, a partir do sêmen descongelado que foi previamente adicionado da fração 3 (proteínas de 15 kDa). Na concentração 1× da fração 3 verifica-se que, dentre os 13 parâmetros avaliados, apenas um apresentou piora em relação ao grupo controle, enquanto que na concentração 2× da fração 3, cinco parâmetros apresentaram resultados piores que o grupo controle ($p > 0,05$).

De modo geral, neste tratamento como um todo, os três parâmetros que avaliam a velocidade/rapidez apresentaram expressiva melhora em relação ao grupo controle, sendo eles: velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL) e velocidade de trajeto (VAP).

O parâmetro VCL é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, é sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade; o parâmetro VSL é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro

e o último ponto da trajetória do espermatozoide, e é sempre a mais baixa das três velocidades; o VAP é a velocidade da trajetória média do espermatozoide, e o seu valor depende da regularidade da trajetória da cabeça espermática (Verstegen et al., 2002).

Existe relação positiva para os valores de VAP, VSL e VCL com a taxa de fertilidade, sendo os três parâmetros significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50% (Verstegen et al. 2002)

Tabela 02. Valores obtidos dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das concentrações testadas (**negrito**) para o sêmen tratado com a fração 3. A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição variou em relação ao controle. Valores positivos indicam melhora enquanto que valores negativos indicam piora na condição.

| Parâmetro | Condição/Tratamentos | | | | |
|-----------------------------|----------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | 0 | 1× | % relativa | 2× | % relativa |
| Motilidade Total (%) | 35,01 | 37,10 | 5,97 | 35,40 | 1,11 |
| Mot. Progressiva (%) | 27,50 | 29,52 | 7,35 | 26,95 | -1,98 |
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 60,44 | 64,28 | 6,34 | 78,52 | 29,91 |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 32,85 | 37,50 | 14,14 | 53,17 | 61,85 |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 36,72 | 40,85 | 11,23 | 56,40 | 53,60 |
| DCL (μm) | 20,04 | 22,73 | 13,45 | 18,74 | -6,46 |
| DSL (μm) | 8,26 | 10,55 | 27,67 | 7,99 | -3,24 |
| DAP (μm) | 10,03 | 12,12 | 20,83 | 9,41 | -6,24 |
| ALH (μm) | 0,66 | 0,64 | -3,93 | 0,61 | -8,46 |
| BCF (Hz) | 6,79 | 8,20 | 20,77 | 6,04 | -11,10 |
| WOB | 0,60 | 0,63 | 4,97 | 0,66 | 8,94 |
| LIN | 0,54 | 0,58 | 7,41 | 0,61 | 12,22 |
| Retilinearidade | 0,88 | 0,91 | 3,17 | 0,91 | 3,17 |

A análise conjunta dos dados das figuras 04 e 05, mais as tabelas 01 e 02 sugerem que a adição de concentrações mais baixas (1×) das proteínas de baixa massa molecular promoveu uma melhora no parâmetro motilidade quando adicionado da fração proteica 2 e, melhora no vigor quando adicionado da fração proteica 3, sem promover alterações significativas nos demais parâmetros avaliados.

Por outro lado, a adição de concentração mais alta da fração 2 (2×) promoveu perda da motilidade. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que descrevem que

uma pequena proporção de proteínas do plasma presentes no sêmen antes da congelação, promove uma melhor motilidade espermática, quando comparado com o sêmen resfriado ou criopreservado com altas taxas de proteínas do plasma seminal (Braun et al., 1994; Alghamdi et al., 2002).

Almeida (2006), avaliando os efeitos de diferentes concentrações de plasma seminal na proteção contra o estresse oxidativo e danos na viabilidade da célula espermática pós-descongelação, percebeu que amostras com 5% de plasma se comportam de maneira semelhante a 0%, e concluíram que o plasma seminal possui efeito antioxidante durante a criopreservação, mas esse efeito não protege a viabilidade das células espermáticas de outros danos promovidos pela criopreservação, podendo acentuar os danos quando as concentrações de plasma ultrapassam 25%.

Embora as proteínas presentes nas frações 2 e 3 ainda não tenham sido identificadas, esta constatação vai de encontro aos fatos observados por (Schöneck et al., 1996) de que a adição da proteína seminal de baixa massa molecular (espermadesina aSFP) em sêmen de touros, quando em baixa concentração, possui efeito estimulante sobre a motilidade, porém, efeito inibitório quando em alta concentração.

O cavalo que doou o sêmen utilizado neste ensaio já era considerado um *good freezer*, pois seu sêmen sempre apresentara boa taxa de viabilidade após a descongelação. A adição de uma concentração mais alta (2×) da fração 3 de proteínas praticamente não teve nenhum efeito sobre a motilidade, porém, melhorou o vigor dos espermatozóides em 48,5% considerando a média dos três parâmetros (VCL, VSL e VAP). Em resumo, a presença da fração 3 de proteínas até o limite da concentração utilizada, não influenciou na motilidade, mas influenciou positivamente no vigor, conseguindo melhorar algo que já era considerado bom.

Estudos de análise proteômica (Barrios et al., 2000) e de caracterização bioquímica (Barrios et al., 2005) do plasma seminal de carneiros europeus da raça *Rasa aragonesa*, mostraram que a suplementação do sêmen com duas proteínas de baixa massa molecular (14 e 20 kDa) da própria espécie, preveniram danos a membrana celular dos espermatozóides provocados por choque frio durante a congelação, podendo inclusive reverter danos causados pela congelação, em espermatozóides sem tratamento prévio. Indícios deste tipo de proteção já haviam sido reportados por nosso grupo de pesquisa por meio de simulações computacionais e estudos de ensaios de desnaturação térmica em

espermadesinas de carneiros da raça Texel (Condessa et al., 2017). Contudo, estudos que visam avaliar o possível efeito protetor à membrana celular dos espermatozoides de equinos ainda precisam ser realizados por microscopia eletrônica de varredura.

Conclusões

Os componentes majoritários do plasma seminal de carneiros da raça Dorper correspondem a duas proteínas com massas moleculares de aproximadamente 13 e 15 kDa e foram separadas com sucesso por cromatografia de filtração em gel.

A adição da fração 2 de proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Dorper ao sêmen de cavalo antes da congelação, promoveu um efeito estimulante da motilidade quando em concentração mais baixa, porém, um efeito inibitório expressivo sobre este parâmetro, quando em concentração mais alta.

A adição da fração 3 de proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Dorper ao sêmen de cavalo antes da congelação promoveu um efeito estimulante da motilidade quando em concentração mais baixa, porém, nenhum efeito sobre este parâmetro quando em concentração mais alta. Contudo, promoveu um efeito estimulante sobre o vigor em progressão exponencial à sua concentração.

Agradecimentos

Este projeto foi realizado com apoio financeiro da Fundação Araucária (convênios 147/14 e 40/16), CNPq e CAPES.

Ensaio em andamento e perspectivas futuras

Considerando nossos resultados que demonstraram que proteínas diferentes desempenharam efeitos distintos na viabilidade pós-descongelação nos espermatozoides de equino, torna-se importante a correta identificação de cada uma destas proteínas. Deste modo, para que este trabalho possa estar concluído a ponto de ser submetido a uma revista científica, é necessário identificar as frações 2 e 3 de proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Dorper, as quais foram utilizadas como adjuvantes do sêmen de equino.

Para isso, a purificação de um novo lote com as frações das proteínas 2 e 3 será submetido a estudos de espectrometria de massa para a correta identificação destas proteínas.

Como perspectiva futura seria interessante, do ponto de vista tecnológico, avaliar o quanto a adição da fração 3 do plasma seminal ovino no sêmen equino, poderia influenciar em: 1) Na viabilidade de cavalos (indivíduos) considerados *bad freezers*. 2) No processo de fertilização *in vitro*, uma vez que existem aspectos imunológicos e bioquímicos envolvidos ao se adicionar proteínas estranhas a uma dada espécie, os quais devem ser considerados para ensaios *in vivo*. 3) Em havendo influência positiva é possível considerar a expressão heteróloga da fração 3 de modo a se obter uma quantidade suficiente para repetir este ensaio em outras raças de cavalos. 4) Analisar por meio de microscopia eletrônica de varredura, os possíveis efeitos protetores na membrana do espermatozóide.

Referências

- Alghamdi, A.S., Troedsson, M.H., Xue, J.L., Crabo, B.G., 2002. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American journal of veterinary research* 63, 880-885.
- Almeida, J.L. 2006. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Dissertação de Mestrado, 77 p.
- Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Neto, C.R., 2016. Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice* 32, 521-530.
- Aurich, J., Aurich, C., 2006. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction in domestic animals* 41, 275-279.
- Ayres, H., TORRES-JÚNIOR, J., PENTEADO, L., Souza, A., Baruselli, P., 2006. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. *Acta Scientiae Veterinariae* 34, 410.
- Barbacini, S., Loomis, P., Squires, E., 2005. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89, 203.
- Barrios, B., Fernández - Juan, M., Muiño - Blanco, T., Cebrián - Pérez, J.A., 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of andrology* 26, 539-549.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muino-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of reproduction* 63, 1531-1537.
- Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular reproduction and development* 71, 461-470.
- Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., Oguri, N., 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41, 809-818.

- Calvete, J., Sanz, L., Dostàlovà, Z., Töpfer-Petersen, E., 1995. Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertilität* 11, 35-40.
- Carvalho, G., 1992. Fertility of the Diluted Equine Semen, Cold to 20°C and Transported. Department of Animal Science.
- Condessa, M.A.K.V., Pimentel, A.L., Seixas, F.A.V., Martinez, A.C., 2017. Purification, structural and biophysical characterisation of the major seminal plasma protein from Texel rams. *Animal Reproduction Science*.
- Druart, X., Rickard, J., Mactier, S., Kohnke, P., Kershaw-Young, C., Bathgate, R., Gibb, Z., Crossett, B., Tsikis, G., Labas, V., 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of proteomics* 91, 13-22.
- FAO, 2016. FAOSTAT, Live Animals, Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. Live Animals.
- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., Okabe, K., 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development* 54, 286-289.
- Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59, 1157-1170.
- Gomes, G., Gomes, L., 2009. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 210-215.
- Gomes, G., Jacob, J., Medeiros, A., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, 277-279.
- Hartwig, F., Lisboa, F., Monteiro, G., Maziero, R., Freitas-Dell'Aqua, C., Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Dell'Aqua, J., 2014. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* 81, 340-346.
- Hiwasa, M., Kohno, H., Togari, T., Okabe, K., Fukui, Y., 2009. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development* 55, 50-54.
- Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., Sieme, H., 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science* 125, 112-118.
- Kneissl, S., 1993. Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma:: Einfluß der Samenentnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Mobilität und Mebranintegrität der Samenzellen. na.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227, 680-685.
- Lima, R.A.S., Cintra, A.G., 2016. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 56.
- Loomis, P.R., 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics: Equine Practice* 22, 663-676.
- Miller, C., 2008. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology* 70, 463-468.
- Nath, L., Anderson, G., McKinnon, A., 2010. Reproductive efficiency of Thoroughbred and Standardbred horses in north - east Victoria. *Australian veterinary journal* 88, 169-175.
- Papa, F., Melo, C., Dell'Aqua, J., Macedo, L., Carvalho, A., Alvarenga, M., Medeiros, A., 2005. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Sci Vet* 33, 19-27.

- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A.T., Rodriguez-Gil, J.E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.59, p. 1973-1990.
- Reinert, M., Calvete, J.J., Sanz, L., Mann, K., Töpfer - Petersen, E., 1996. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP - 7, a zona - pellucida - binding protein of the spermadhesin family. *The FEBS Journal* 242, 636-640.
- Sá Filho, M., Torres-Júnior, J., Penteado, L., Gimenes, L., Ferreira, R., Ayres, H., e Paula, L.C., Sales, J., Baruselli, P.S., 2010. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science* 118, 182-187.
- Samper, J., Pycock, J., McKinnon, A., 2006. Insemination with Frozen Semen: Some Management Considerations for Stallions, In: Samper, J., McKinnon, A. (Eds.), *Current Therapy in Equine Reproduction*, Elsevier-Sounders, pp. 285-288.
- Schöneck, C., Braun, J., Einspanier, R., 1996. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology* 45, 633-642.
- Terraciano, P.B., 2009. Criopreservação de espermatozóides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Acta Scientiae Veterinariae* 37, 109-110.
- Töpfer - Petersen, E., Romero, A., Varela, P., Ekhlasi - Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L., Calvete, J., 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30, 217-224.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- Watson, P., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60, 481-492.

PARTE III - ELEMENTOS PÓS TEXTUAIS

ANEXO 1

Normas de submissão do artigo para a revista *Animal Reproduction Science*

PEER REVIEW

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final.

ARTICLE STRUCTURE

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three keyreferences should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

ESSENTIAL TITLE PAGE INFORMATION

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that

author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

ABSTRACT

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

KEYWORDS

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

ARTWORK

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g.,

ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only.

TABLES

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/animalreproductionsience>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. **Single author:** the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. **Two authors:** both authors' names and the year of publication;
3. **Three or more authors:** first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.