

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

ESPERMADESINA OVINA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

LUAN SITÓ DA SILVA

UMUARAMA - PR

JANEIRO/2021

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

ESPERMADESINA OVINA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

Nível: Mestrado

Área de concentração: Produção Sustentável

Autor: Luan Sitó da Silva

Orientador: Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas

Dissertação apresentada como parte das exigências ao Programa de Pós-graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

UMUARAMA - PR

JANEIRO/2021

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

S586e Silva, Luan Sitó da
Espermadesina ovina na criopreservação de sêmen equino / Luan Sitó da Silva. --
Umuarama, PR, 2021.
74 f.: il. color., figs., tabs.
Orientador: Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez.
Coorientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências
Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em
Produção Sustentável e Saúde Animal, 2021.

CDD 23.ed. 636.082


FOLHA DE APROVAÇÃO

Luan Sitó da Silva

“Espermadesina Ovina na Criopreservação de Sêmen Equino”

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. Antonio Campanha Martinez

Universidade Estadual de Maringá-UEM(Presidente)


Prof. Dra. Eunice Oba

Universidade Estadual Paulista-UNESP (Membro)


Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira Junior

Universidade Estadual de Maringá-UEM (Membro)

Aprovada em: 29 de janeiro de 2021.

Local da defesa: forma remota.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marinei de Araújo Sitó da Silva e Gilmar José da Silva, pelo amor sem medida, carinho, apoio e por sempre se fazerem presentes, mesmo com a distância. Aos meus irmãos, Mariana Sitó da Silva e Marcos Vinicius da Silva pelo carinho.

DEDICO A VOCÊS ESTA VITÓRIA!

AGRADECIMENTOS

Agradeço grandiosamente a Deus pelas infinitas bênçãos e bondade, para que fosse possível a realização desse mestrado.

A minha família pelo apoio sem fim e amor incondicional. Não existem palavras que possam agradecer tudo o que fazem por mim. Pai e mãe, vocês são meus exemplos. Assim como meus irmãos onde tenho um amor infinito. Amo vocês.

Ao Sr. Rubens por disponibilizar os ovinos para colheita seminal, pois sem esses o estudo não poderia ter sido realizado.

Ao Médico Veterinário e amigo Leonardo Ferrari por conseguir os garanhões para colheita seminal, pois sem isso não seria possível finalizar o estudo.

Ao Professor Dr. Gentil Vanini, e ao centro de pesquisa da Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM/Maringá, por autorizar a utilização do equipamento Androvision® durante a realização do experimento de avaliação espermática.

Ao Professor Dr. Flávio Seixas, meu coorientador, do Laboratório de Bioquímica Estrutural do departamento de Bioquímica da UEM - Campus CTC, sua estagiária Tainá da Cruz e sua doutoranda Elizangela por me ajudarem e proporcionarem tantos ensinamentos para a realização da purificação das proteínas.

A CAPES, pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Aos membros da comissão avaliadora de qualificação, Professor Dr. André Marcos Santana e Professor Dr. Max Gimenez Ribeiro por disponibilizarem o seu tempo para contribuir com o meu aprendizado e crescimento profissional.

Ao Professor Dr. Oduvaldo Camara Marques Pereira Junior e a Professora Dra. Eunice Oba, por participarem da defesa da dissertação, e contribuírem muito para a melhoria do trabalho.

E, principalmente, ao meu orientador Professor Dr. Antonio Campanha Martinez. Sou imensamente grato por esses 7 anos não só de orientação, mas de parceria e risadas, obrigado pelas oportunidades que me ofereceu, pelas tantas viagens que fez comigo, para realização do meu experimento, pelos gastos em que não se poupou para que fosse possível a realização desse estudo, pelo tempo dedicado, pela paciência e por me ofertar tanto aprendizado em todo esse tempo de graduação e mestrado.

Meus mais sinceros agradecimentos a cada um que indiretamente também me ajudou em todo esse tempo de mestrado e na execução desse trabalho.

Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.

Martin Luther King Jr.

Espermadesina Ovina na Criopreservação de Sêmen Equino

Resumo

A equinocultura no Brasil vem se fortalecendo, ao longo dos anos como atividade pecuária, sendo uma das biotecnologias que ainda é muito aplicada é a inseminação artificial, por isso a correta colheita e manipulação do sêmen são essenciais para o sucesso da técnica, podendo ser utilizado o sêmen fresco, fresco resfriado ou congelado. Os principais componentes do plasma seminal de carneiros Dorper correspondem a proteínas com peso molecular variando entre ~ 12 e ~ 18 kDa, pertencentes ao grupo das espermadesinas e proteínas contendo domínios de fibronectina tipo II. É sabido que o sêmen de garanhões não apresenta boa congelabilidade, tendo grande variação dentro da própria espécie. Assim objetivo foi avaliar o efeito da proteína majoritária do sêmen de carneiros da raça Dorper no diluente seminal para congelação de sêmen equino. O plasma seminal de 14 ovinos de aproximadamente 12 meses de idade foi separado por centrifugação e as proteínas separadas por meio de cromatografia de filtração em gel e a pureza das amostras foi verificada por meio de eletroforese. Após a purificação de duas frações proteicas de peso molecular de aproximadamente 15,1 e 18,5 kDa, essas foram adicionadas ao diluente seminal de congelação de três garanhões da raça quarto de milha, nas proporções de 0, 1x e 2x, sendo as amostras congeladas em nitrogênio líquido até a análise por sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Após a descongelação foi verificado que a adição da fração dois melhorou somente três parâmetros seminais avaliados pelo CASA dos 12 avaliados, já a fração três da proteína melhorou 11 parâmetros dos 12 estudados. Concluindo assim que a adição da fração DorperSPP-2 contendo proteínas parcialmente purificadas de plasma seminal de carneiros Dorper ao sêmen de cavalo antes do congelamento não influenciou significativamente os parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema CASA. A adição da proteína DorperSPP-3 purificada ao sêmen de cavalo antes do congelamento até a concentração de 0,036 g/dL⁻¹ promoveu um efeito estimulante sobre os principais parâmetros avaliados pelo CASA linearmente de forma dependente da concentração até o limite das concentrações utilizadas nestes ensaios.

Palavras-chave: congelação, garanhão, ovino, proteína.

Ovine sperm in the cryopreservation of equine semen

Abstract

Horse production in Brazil has been strengthening over the years as a livestock activity, one of the biotechnologies that is still widely applied is artificial insemination, so the correct collection and manipulation of semen are essential for the success of the technique, and can be used fresh semen, chilled or frozen. The main components of Dorper sheep seminal plasma correspond to proteins with molecular weight varying between ~ 12 and ~ 18 kDa, belonging to the group of sperm and proteins containing type II fibronectin domains. It is known that stallion semen does not present good freezer, having great variation within the species itself. Thus, the objective was to evaluate the effect of the major semen protein of Dorper sheep in the seminal diluent for freezing equine semen. The seminal plasma of 14 sheep of approximately 12 months of age was separated by centrifugation and the proteins separated by means of gel filtration chromatography and the purity of the samples was verified by means of electrophoresis. After

the purification of two protein fractions of molecular weight of approximately 15.1 and 18.5 kDa, these were added to the seminal freezing diluent of three quarter-mile stallions, in the proportions of 0, 1x and 2x, with the samples being frozen in liquid nitrogen until analysis by computerized semen analysis system (CASA). After thawing it was found that the addition of fraction two improved only three seminal parameters evaluated by CASA of the 12 evaluated, whereas fraction three of the protein improved 11 parameters of the 12 studied. Therefore, concluding that the addition of the DorperSPP-2 fraction containing partially purified proteins from seminal plasma of Dorper sheep to horse semen before freezing did not significantly influence the sperm parameters evaluated by the CASA system. The addition of purified DorperSPP-3 protein to horse semen before freezing to a concentration of 0.036 g / dL-1 promoted a stimulating effect on the main parameters evaluated by CASA linearly in a concentration-dependent manner up to the limit of the concentrations used in these assays.

Keywords: freezing, stallion, sheep, protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cromatografia de coluna	-22
Figura 2. Cromatografia de exclusão por tamanho	-23
Figura 3. Projeto experimental para adição das proteínas DorperSPP-2 e DorperSPP-3 ao sêmen de cavalo e armazenamento	-27
Figura 4. Cromatogramas de eluição obtidos pela passagem de amostras por diferentes colunas de filtração em gel	-29
Figura 5. Cromatograma mostrando a eluição da fração DorperSPP-2 através da coluna Superdex S200-10 / 300	-30
Figura 6. SDS-PAGE corado com prata 15%	-31
Figura 7. Parâmetros de viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas para a mistura da proteína DorperSPP-2	-32
Figura 8. Parâmetros de viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas para a mistura da proteína isolada DorperSPP-3	-33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variações obtidas a partir dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das condições de ensaio (negrito) para sêmen tratado com a mistura de proteínas DorperSPP-2 -32
- Tabela 2.** Variações obtidas a partir dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das condições de ensaio (negrito) para sêmen tratado com a mistura de proteínas DorperSPP-3 -34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% :Porcentagem

`: altura

": segundos

μL: Microlitro

ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça

AQN-1/ AQN-3/ AWN/PSP-I/PSP-II: Espermedesinas de Suínos

BCF: frequência de batimento cruzado

Bdh-1/Bdh-2/Bdh-3/Bdh-4/BSFP: Espermedesinas de Caprinos

BSP: Esperdesinas de Touros

CASA: Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen

CBRA: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

cm: Centímetros

CRISPs: Proteínas Ricas em Cisteína

CUB: tipo de domínio proteico

DAP: distância média percorrida

DCL: distância curvilínea

dL: Decilitro

DSL: distância linear

Fn II: Proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II

g: Gramas

GPC: Glicerilfosforilcolina

HSP-1/ HSP-2/ HSP-6/ HSP-7/ HSP-8: Proteína Seminal de Garanhões

kDa: Kilodalton

LIN: linearidade

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg: Miligrama

min: Minutos

mL: Mililitro

nm: nanômetro

°C: Graus celsius

pH: Potencial hidrogênico

seg: segundos

SDS-PAGE: Dodecilsulfato de sódio

VAP: velocidade média do caminho

VCL: velocidade curvilínea

VSL: velocidade em linha reta

WOB: oscilação

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 Equideocultura	16
1.2 Plasma Seminal	17
1.3 Purificação proteica	22
2. HIPÓTESES	25
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. JUSTIFICATIVA	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Colheita de sêmen ovino	25
5.2 Purificação da espermaresina	26
5.3 Colheita de sêmen equino	26
5.4 Procedimento Experimental e Congelação do sêmen	26
5.5 Descongelamento do Sêmen	28
5.6 Análise da viabilidade espermática pós descongelamento	28
6. RESULTADOS	29
6.1 Cromatografia de filtração em gel	29
6.2 Validação da purificação de proteínas do plasma seminal de carneiro	31
6.3 Criopreservação de sêmen equino tratado	32
7. DISCUSSÃO	35
8. CONCLUSÕES	38
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
PARTE II – ARTIGO CIENTÍFICO	46
RESUMO	47
1. Introdução	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Colheita de sêmen ovino	49
2.2 Purificação da espermaresina	49
2.3 Colheita de sêmen equino	50
2.4 Procedimento Experimental e Congelação do sêmen	50
2.5 Descongelamento do Sêmen	52

2.6 Análise da viabilidade espermática pós descongelação	52
3. RESULTADOS	52
3.1 Cromatografia de filtração em gel	52
3.2 Validação da purificação de proteínas do plasma seminal de carneiro	55
3.3 Criopreservação de sêmen equino tratado	56
4. DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
PARTE III – ELEMENTOS PÓS TEXTUAIS.....	65
ANEXO 1. Normas para submissão de artigo para a revista Theriogenology	66

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Equideocultura

A equideocultura no Brasil vem se fortalecendo ao longo dos anos como atividade pecuária em crescimento apresentando atualmente uma população de aproximadamente 5.501.872 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2019). A população de equídeos é representada por 69,4% de equinos (*Equus caballus*), 14,2% de asininos (*Equus asinus*) e 16,4% de muares (*Equus asinus caballus*) e estão distribuídos nas regiões sudeste (23,9%); Nordeste (23,3%); Centro-Oeste (19,8%); Norte (17,0%); Sul (16,0%) (IBGE, 2018).

Segundo Ministério da Agricultura da Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2016), a renda gerada no complexo do agronegócio do cavalo no Brasil, em valores de abril de 2015, totalizou R\$ 16,15 bilhões, ocupando direta e indiretamente aproximadamente 3 milhões de pessoas, diretamente são 607.329 pessoas e, considerando o fato de que cada ocupação direta proporciona outras quatro ocupações indiretas, estima-se que são gerados 2.429.316 empregos indiretos, pelo fato do crescimento da criação voltada para o público urbano, tanto para lazer quanto para esporte. Diferentemente dos animais criados para serviço, em geral associados à bovinocultura, o cavalo de esporte ou de lazer requer gastos e cuidados mais elevados. São animais que movimentam com maior intensidade desde a indústria de medicamentos e ferragens até cosméticos e acessórios. Juntamente com este consumidor, também cresce o número e tamanho dos eventos, como provas de tambor e baliza, vaquejadas entre outros.

Um grande progresso na economia mundial ocorreu na geração de cavalos destinados as atividades esportivas como fonte geradora de empregos, sendo um mercado de constante crescimento nas últimas décadas (MONTECHIESI, 2015), com a importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer, não sendo mais apenas utilizado para o transporte ou tração animal, é indiscutível o crescimento mundial da equideocultura (MARIZ, 2008).

A utilização de biotecnologias que permitam maior aproveitamento na reprodução equina tem sido desde então amplamente empregado por criadores, como as técnicas de criopreservação de sêmen. Uma das principais vantagens da utilização das biotecnologias voltada à criopreservação de sêmen está na diminuição dos custos e riscos no transporte dos animais que se deseja reproduzir, incluindo a possibilidade de uso de animais de países diferentes, assim como controle de doenças, maior aproveitamento de animais geneticamente

superiores e possibilidade de utilização do sêmen de garanhões que estão em atividade esportiva, doentes ou até mesmo animais que vieram a óbito (MOURA, 2017).

Uma das biotecnologias que ainda é muito aplicada é a inseminação artificial (IA), por isso a correta colheita e manipulação do sêmen são essenciais para o sucesso da técnica, podendo ser utilizado o sêmen fresco, fresco resfriado ou congelado. Porém, um dos problemas observado é quanto aos criadores terem selecionado os garanhões quanto ao seu desempenho atlético e não reprodutivo o que tornou a manipulação espermática um pouco mais delicada que nas outras espécies, devido ausência de seleção por critérios de fertilidade (WOODS et al., 1990). Na IA é de suma importância a realização do exame andrológico, pois ele reflete as atuais condições reprodutivas do macho. O potencial reprodutivo do animal deve ser verificado anteriormente ao início da estação de monta para diagnóstico de sub ou infertilidade e adequação do melhor método para comercialização do sêmen (PAPA et al., 2007; CONTRI et al., 2010).

1.2 Plasma Seminal

O plasma seminal é formado por uma mistura de secreções de vários órgãos como os testículos, epidídimos e glândulas acessórias (HENALUT et al., 1995). Possui um significado fisiológico muito importante, sendo carreador dos gametas masculinos até o trato genital feminino, dando condições para a viabilização do processo de fertilização (RONCOLETTA et al., 1999). Nos equinos, o plasma seminal é composto pelas secreções de várias estruturas, como os epidídimos, das ampolas dos ductos deferentes, das vesículas seminais, da próstata, e das glândulas bulbo-uretrais. A secreção dos órgãos genitais do garanhão é comumente dividida em três frações (AMANN e GRAHAM, 1993).

A primeira porção ejaculada é uma fração pré-espermática, aquosa, sem espermatozoides, glicerilfosforilcolina (GPC), ergotineína ou ácido cítrico (AMANN e GRAHAM, 1993), tem como função a limpeza da uretra, e é rica em cloreto de sódio (KELLER et al, 2001), sendo produzido pela próstata e pelas glândulas bulbouretrais (AMANN e GRAHAM, 1993). A segunda fração é rica em espermatozoides, GPC e ergotineína, conteúdo pouco ácido cítrico ou gel, é liberada poucos segundos após e tem aspecto leitoso. Esta fração contém secreções dos epidídimos e das ampolas dos ductos deferentes. A terceira fração contém grandes quantidade de gel e ácido cítrico, com poucos espermatozoides ou ergotineína. Este

fluido é produzido nas vesículas seminais e tem por função remover os poucos espermatozoides que permaneceram na uretra no momento da ejaculação (AMANN e GRAHAM, 1993).

Foi demonstrado que o plasma seminal atua na manutenção da motilidade e viabilidade espermática (MAXWELL et al., 1996), assim como aumenta a resistência dos espermatozoides ao choque térmico (MORTIMER e MAXWELL, 2004). O plasma seminal ajuda na manutenção e manutenção de boas condições para que a motilidade, sobrevivência e o transporte espermático não só no trato reprodutivo feminino, mas no masculino também (TÖPFER-PETERSEN et al., 2004). Sendo assim, por ser tão complexo, é muito importante para o estudo e identificação de potenciais biomarcadores relacionados a fatores reprodutivos, como por exemplo a fertilidade dos machos (GONZÁLEZ-CADAVID et al., 2014). É sabido que somente um marcador biomolecular ou processo fisiológico não é suficiente para prever a capacidade de fecundação espermática, pois este é um processo multifatorial (SALVADOR e SALVADOR, 2019).

Um dos componentes do plasma seminal são as proteínas. Estas influenciam nas funções espermáticas e na fertilidade e são divididas em três principais famílias nos animais ungulados: proteínas ricas em cisteínas (CRISPs), proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (fn II) e proteínas da família das espermedesinas (BERGERON et al., 2005; CAJAZEIRAS, 2009).

A composição molecular do plasma seminal possui características diferentes em cada espécie, podendo ser diferente tanto em tipos como a atuação das proteínas espermáticas. O plasma seminal dos Bovídeos possui a família das proteínas designadas de BSP-A1/-A2 e BSP-A3 (15-17kDa), BSP-30 (28- 30kDa) (MANJUNATH, 1984). Segundo Topfer-Peterson et al. (2004), os equinos possuem as proteínas HSP-1 (22-25kDa), HSP-2 (25kDa, pI 6,5-6,9), HSP-7 (14kDa) e HSP-12 kDa pertencentes à família das espermedesinas e a SP-1 possui correlação positiva com a fertilidade.

As espermedesinas foram identificadas no suíno (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II) (SANZ et al., 1992), nos bovinos (aSFP e Z13) (WEMPE et al., 1992; TEDESCHI et al., 2000), no ovino (espermedesina de 15,5 kDa) (BERGERON et al., 2005), no equino (HSP-7) (REINERT et al., 1996), e em caprinos (BSFP e Bdh-1; Bdh-2; Bdh-3 e Bdh-4) (TEIXEIRA et al., 2002; MELO et al., 2008), sendo o principal componente proteico do plasma seminal no suíno. Nesta espécie, as espermedesinas representam mais de 90% das proteínas do plasma seminal (TOPFER-PETERSEN et al., 1998).

As espermedesinas são um grupo de polipeptídeos de 12 a 16 KDa encontradas no plasma seminal e perifericamente associado com a superfície dos espermatozoides de animais domésticos, como suínos, bovinos e equinos (REINERT et al., 1996; TEDESCHI et al, 2000). Essas proteínas são pertencentes à família das lectinas animais e apresentam 110-113 resíduos de aminoácidos, constituídas estruturalmente por um único domínio CUB que serve como suporte estrutural e pode se atribuir diferentes funcionalidades (ROMERO et al., 1997).

Wempe et al. (1992) e Schoneck et al. (1993), estão entre os primeiros a pressuporem as características e funções das espermedesinas. Dostàlovà et al., (1994) acreditaram que o papel fisiológico dessas proteínas estaria ligado ao processo de capacitação, reconhecimento e ligação dos gametas masculino e feminino, ou seja, entre o espermatozoide e o oócito. Topfer-Petersen et al. (1998), afirmaram que a espermedesina seria uma proteína que pode se ligar aos carboidratos da zona pelúcida do oócito, dentre as várias proteínas existentes no plasma seminal. Estudos recentes demonstraram que, por conta das características termodinâmicas da proteína, ela também pode desempenhar um papel importante na viabilidade espermática pós-descongelamento (CONDESSA et al., 2018).

Já foram identificadas mais de 700 proteínas presentes no plasma seminal de carneiros (SOLEILHAVOUP et al., 2014). Souza et al., (2012) identificaram 41, Goularte et al., (2014) identificaram 6 bandas proteicas consideradas candidatas como marcadores de tolerância espermática para congelamento, sendo que várias destas poderão, futuramente, ser utilizadas em funções específicas do sêmen como biomarcadores, podendo ajudar a entender melhor o papel do plasma seminal na fertilidade do macho. Recentemente foram identificados marcadores de resistência a congelamento (RICKARD et al., 2015). Segundo Soleilhavoup et al (2014), proteínas do plasma são capazes de proteger os espermatozoides dos danos causados pelo choque térmico da criopreservação, sugerindo que as proteínas responsáveis por manter essas propriedades protetoras são as espermedesinas.

Trabalho realizado com 56 touros da raça Brahman analisou os atributos bioquímicos das proteínas identificadas e chegou à conclusão que estas podem participar em vários processos como a maturação, proteção, capacitação espermática, sobrevivência no oviduto, reação acrossômica e na fertilização (RÊGO et al., 2014).

Vêm-se demonstrando a importância do plasma seminal em auxiliar positivamente na fertilidade, além de servir também como diluente e veículo para os espermatozoides, exercendo função estimulante na motilidade espermática durante o processo de ejaculação. Segundo vários

autores é provável que várias proteínas do plasma seminal possuam funções moduladoras, propriedades como a capacitação espermática, reação acrossômica e interação espermatozoide-oócito, dentre outras (SOUZA et al., 2012; SOLEIHAVOUP et al., 2014; LUNA et al., 2015).

A quantidade de proteínas de preservação pode variar entre os machos, algumas espécies podem apresentar uma sensibilidade maior à criopreservação, podendo ser animais classificados como de baixa ou alta congelabilidade (SOLEILHAVOUP et al., 2014). Um dos marcadores moleculares que pode ajudar, é o conhecimento do perfil proteico do plasma seminal, fazendo com que no futuro possam ser selecionados reprodutores com a ausência ou presença de certas proteínas, atribuindo assim qualidade ao sêmen e sendo uma ótima ferramenta a ser utilizada (NASCIMENTO et al., 2012). A expectativa de se ter em mãos estes marcadores que podem contribuir para a avaliação do desempenho do animal vem sendo objetivo de várias pesquisas, possivelmente contribuindo significativamente na seleção de reprodutores (JOBIM et al., 2009).

A secreção das proteínas, além de ser realizada por várias glândulas acessórias, no epidídimo a secreção é regionalizada, sendo a cabeça e o corpo as regiões mais ativas. Nos equinos, cerca de 73% dos compostos proteicos são secretados na cabeça dos epidídimos (GATTI et al., 2004). As proteínas epididimárias adquiridas pela membrana espermática durante o trânsito epididimário são classificadas de acordo com o tipo de interação com as células espermáticas. Ligações fracas podem ocorrer, responsáveis pela quiescência dos espermatozoides ou ligações fortes, que nos órgãos genitais da fêmea e na fertilização são importantes ou modificações das proteínas da membrana plasmática, encobrindo ou expondo receptores ou até mesmo a presença de proteínas livres no fluido epididimário, colaborando com a manutenção do meio (MARENCO, 2008).

A concentração de proteínas do plasma seminal equino é relativamente baixa (10 mg/mL) quando comparada a outros mamíferos (20-60 mg/mL). As principais proteínas isoladas e encontradas no plasma seminal equino (horse seminal plasma proteins, HSP), são descritas como HSP-1 a HSP-8, apresentam de 14 a 30 kDa. Todas apresentam propriedades de ligação aos espermatozoides durante a ejaculação e podem ser isoladas nos espermatozoides do ejaculado, com exceção da HSP-4 (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Essas proteínas foram subdivididas em três grupos: as proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs), proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2) e proteínas da família das espermadesinas (KARESKOSKI e KATILA, 2008).

A proteína HSP-7 no equino é uma das principais proteínas do plasma seminal associada à membrana plasmática do espermatozoide. Esta proteína equina é homóloga a espermedesina suína (TOPFER-PETERSEN et al., 2005). A HSP-7 possui como função a interação com carboidratos expressos no epitélio da tuba uterina e pode ser uma das envolvidas na formação de reservatórios espermático. As proteínas HSP-1 e HSP-2, agora chamadas de SP-1 e SP-2, são membros da família de proteínas fibronectina-2, também foram identificados no plasma seminal equino e são envolvidas no estabelecimento do reservatório espermático da tuba uterina (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002).

Algumas vantagens que foram alcançadas com os avanços na congelação e na IA com sêmen congelado equino foram o menor custo de transporte, disponibilidade do sêmen, melhor programação da inseminação e menor risco na transmissão de doenças venéreas. Porém, já se sabe que as IAs utilizando sêmen congelado ainda resultam em menores taxas de gestação, quando comparadas aos resultados com sêmen a fresco ou resfriado (WATSON, 2000; ALVARENGA et al., 2016).

A faixa crítica de temperatura para os espermatozoides no processo de congelação é de -3°C e -10°C , pois durante essa faixa de temperatura ocorre a formação de cristais de gelo e a liberação do calor latente de fusão, que leva a um aumento de temperatura do sistema e às maiores injúrias celulares (CHAVEIRO et al., 2006). Durante essa faixa crítica, existe mudança no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, alterando o equilíbrio celular e ocorrendo a desidratação da célula, fazendo com que nesse ponto, a curva de congelação deva ser lenta para evitar a congelação da água intracelular (ALVARENGA et al., 2016).

A curva de congelação é importante na manutenção da integridade celular. Quando se trata da curva ideal, a melhor velocidade deve ser lenta o bastante para permitir a desidratação suficiente da célula espermática, para se evitar a formação de cristais de gelo intracelular, e rápida o bastante para evitar a exposição dos espermatozoides nas soluções hipersaturadas no momento da formação dos cristais de água no ambiente extracelular (AMANN e GRAHAM., 1993; WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2007).

A curva de congelação tida como ótima varia entre as temperaturas de -30 e $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na maioria das espécies animais, com bons resultados na viabilidade celular (MEDRANO et al., 2009). No entanto, em equinos, em função de fatores individuais e raciais relacionados à resistência dos espermatozoides (ALVARENGA et al., 1999), a curva de congelação com melhores resultados varia entre -20 e $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (SIEME et al., 2008), dependendo do método

de processamento do ejaculado e do tipo de armazenamento dos espermatozoides. Assim, as máquinas de congelamento podem minimizar as variações individuais (MEDRANO et al., 2009).

Na seleção dos equinos, diferente de outras espécies, se dá pouca ou nenhuma importância para a fertilidade, onde os animais de melhor desempenho atlético e melhor fenótipo 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 têm correlação hereditária e a prática da constante da utilização de garanhões sem se preocupar com a capacidade reprodutiva, camuflando a subfertilidade com a utilização de tecnologias de reprodução assistida, resultou em populações de equinos com taxas de concepção muito menores que outras espécies (NATH et al., 2010).

1.3 Purificação proteica

Para se trabalhar como uma proteína individualmente, ela deve ser purificada e para isso, o método clássico para separação de proteínas se dá separando-as aproveitando suas propriedades que variam de uma para outra, incluindo carga, propriedade de ligação e o tamanho (NELSON e COX, 2014). Os métodos mais eficientes para fracionar proteínas utilizam a cromatografia em coluna, que se utiliza de diferentes tipos de cargas das proteínas, tamanho, afinidade de ligação e outras propriedades, assim como a cromatografia de troca iônica, e a cromatografia de troca catiônica (NELSON e COX, 2014).

A cromatografia em coluna (Figura 1), é constituída de um material sólido poroso com propriedades químicas adequadas (fase estacionária) e é mantido em uma coluna, assim como uma solução tamponada (fase móvel) que migra através dela. Nessa solução tamponada está também a proteína dissolvida, é colocada no topo da coluna, para estabelecer a fase móvel. A proteína então atravessa a matriz sólida como uma banda que se expande cada vez mais no interior da fase móvel maior. Proteínas individuais migram com mais rapidez ou lentidão através da coluna, dependendo de suas propriedades (NELSON e COX, 2014).

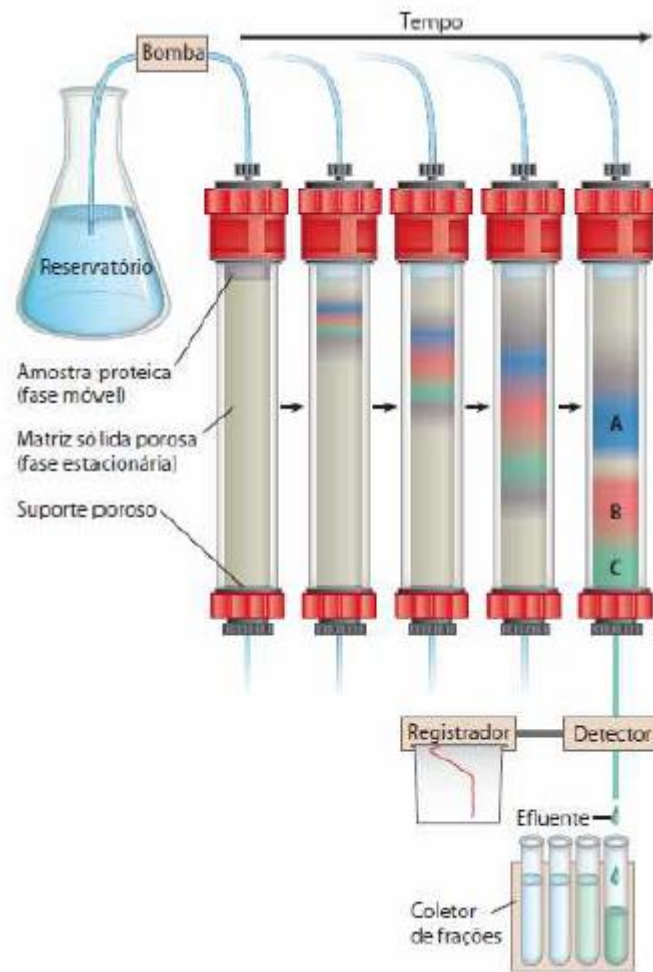


Figura 1. Cromatografia de coluna; coluna cromatográfica consiste em duas fases sendo estas a fase estacionária (matriz porosa) e fase móvel (solução). Além da coluna, mostra o reservatório (contendo a amostra a ser purificada), detector, registrador e coletor para frações de purificação. Fonte: NELSON e COX, 2014

Ainda na cromatografia em coluna os elementos padrões dela incluem um material poroso (matriz) sólido apoiado no interior de uma coluna, geralmente feita de plástico ou vidro, e uma solução, fase móvel, que flui através da matriz, também chamada de fase estacionária. A solução do topo é responsável por substituir a solução que sai da coluna (efluente). A solução proteica a ser separada é colocada no topo da coluna e deixada percolar pela matriz sólida. Mais solução é adicionada ao topo. A solução proteica forma uma banda no interior da fase móvel que tem inicialmente a profundidade da solução de proteína aplicada. À medida que as proteínas migram através da coluna, elas são retardadas em diferentes graus 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, 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 (NELSON e COX, 2014).

A cromatografia em coluna por exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel, separa as proteínas de acordo com o tamanho, onde as proteínas maiores emergem da coluna mais cedo do que as menores. A fase sólida consiste em grânulos de polímeros reticulados com poros ou cavidades projetados com determinado tamanho, assim as proteínas grandes não podem entrar nas cavidades, e tomam um caminho mais rápido através da coluna, ao redor dos grânulos, o que não acontece com as proteínas pequenas que penetram nas cavidades e são retardadas no processo, como demonstrado na Figura 2 (NELSON e COX, 2014).

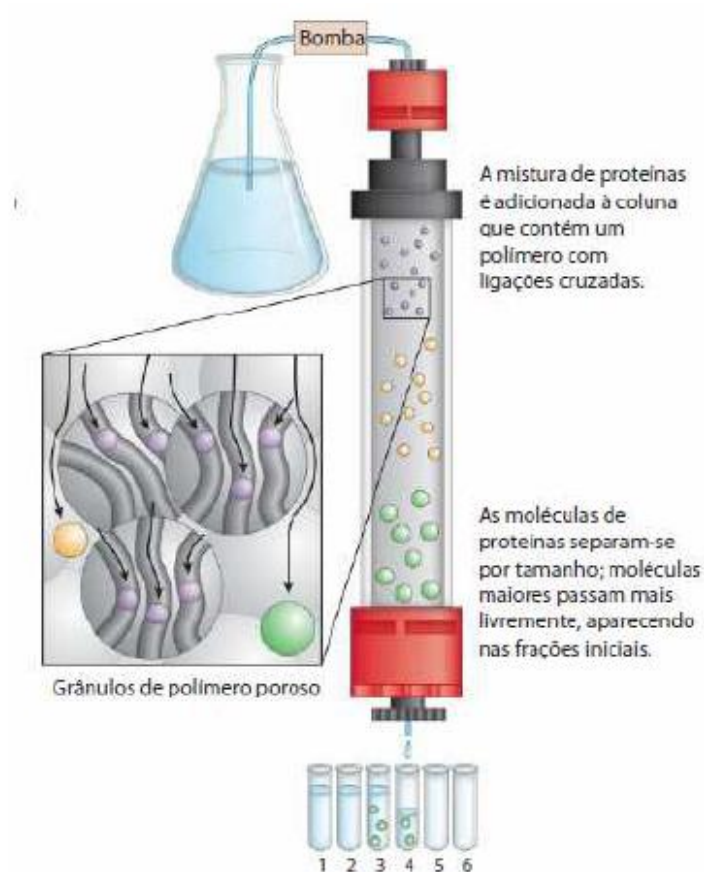


Figura 2. Cromatografia de exclusão por tamanho. A mistura de proteínas é adicionada a coluna e as moléculas são separadas por tamanho, sendo assim, moléculas maiores passam livremente, aparecendo logo nas frações iniciais. Fonte: NELSON e COX, 2014

2. HIPÓTESES

A espermedesina ovina é benéfica à qualidade do sêmen de equinos, auxiliando no vigor e motilidade pós-descongelamento, minimizando danos causados aos espermatozoides pelo processo de criopreservação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da espermedesina do plasma seminal ovino na qualidade do sêmen equino.

3.2 Objetivos Específicos

- Purificar as espermedesinas do plasma seminal ovino por meio de centrifugação e cromatografia;
- Avaliar a viabilidade seminal equina, *in vitro*, utilizando diluente com espermedesina ovina.

4. JUSTIFICATIVA

Este estudo teve por finalidade avaliar o efeito das espermedesinas do plasma de ovinos da raça Dorper, no sêmen de equinos, sendo de grande contribuição para a proteômica seminal na reprodução desta espécie, pois se verificarmos que essas proteínas têm propriedades crioprotetoras, trazendo benefícios às técnicas de congelamento e aos parâmetros seminais poderão, neste caso, ser adicionadas a doses de sêmen, e se por ventura tiverem efeito não crioprotetor, propor sua retirada do plasma seminal antes da congelamento.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Colheita de sêmen ovino

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA / UEM) sob o protocolo nº 2253120516, em atendimento à Lei 11794/2008.

Amostras de plasma seminal foram colhidas de 14 carneiros (uma amostra por animal), da raça Dorper de aproximadamente 12 meses de idade de uma mesma propriedade de ovinos parceira do Laboratório de Criação e Reprodução Animal – UEM, Campus Umuarama, por meio de eletroejaculação.

Após a colheita, o sêmen foi acondicionado em recipiente apropriado (microtubo de centrifugação) para então ser realizada a centrifugação e obtenção das amostras do plasma que foi separado ainda na propriedade, por centrifugação a 670 G por 10min em centrífuga clínica

(Metroterm®) e, em seguida misturados para formar um pool plasmático. Foi adicionado a esta mistura 5 mL de inibidor de protease P9599 (Sigma®) para evitar degradação da amostra.

5.2 Purificação da espermedesina

A purificação das proteínas foi realizada no Laboratório de Bioquímica Estrutural do departamento de Bioquímica da UEM - Campus CTC. O volume de 200µL plasma seminal ovino colhido foi inserido em uma coluna cromatográfica de 27 ´ 1,5 cm (altura ´ 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 cromatógrafo Akta Pure-M (GE Life Sciences®). Os picos de eluição correspondentes foram concentrados com as diferentes proteínas coletadas separadamente, com a utilização de concentradores Amicon 10.000 MWCO (Millipore®) a 4°C em centrífuga (Sigma® 3k30). A fração eluída que continha as proteínas de interesse foi concentrada e 100µL inseridos 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. Sucessivas cromatografias foram realizadas dessa maneira. A pureza das amostras e o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal ovino foram obtidas por meio de SDS-PAGE a 15% corada com nitrato de prata (LAEMMLI, 1970). As proteínas foram analisadas pelo método de Biureto por meio de kit diagnóstico da Gold Analyza®. Ao final, as proteínas de interesse foram congeladas a -80°C até o momento do uso.

5.3 Colheita de sêmen equino

Os animais selecionados pertencem a um Centro de Colheita de Sêmen da cidade de Umuarama, Paraná, Brasil e estavam em rotina de colheita de sêmen. Uma amostra de sêmen de cada equino foi colhida por meio de vagina artificial, modelo Colorado, de três cavalos da raça Quarto de Milha, de cinco anos, que atendiam às normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), com auxílio de égua em cio como manequim, devidamente contida para evitar acidentes com o garanhão e com o médico veterinário que colheu o sêmen.

5.4 Procedimento Experimental e Congelação do sêmen

O sêmen equino foi congelado no Centro de Colheita de Sêmen seguindo o método proposto por Kneissl (1993), no qual a refrigeração é realizada primeiramente, seguida da congelação em nitrogênio líquido. Para tanto, o sêmen total colhido foi avaliado quanto à

motilidade e vigor, bem como uma avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Todos os parâmetros avaliados estavam de acordo com os padrões mínimos descritos pelo CBRA. Após a colheita, um diluente de transporte Botusêmen (Botupharma®) foi adicionado ao sêmen. Em seguida, foi centrifugado a 670G por 10 min para retirada do plasma seminal (sobrenadante), que foi descartado. O volume do precipitado contendo espermatozoides foi de aproximadamente 3.750 μL , e o diluente de congelação de sêmen equino comercial (Botucurio / BotupharmaTM) foi adicionado na proporção de 1:1, totalizando 7.500 μL .

Esta solução foi dividida em cinco microtubos contendo 1500 μL cada. A proporção de proteína adicionada ao sêmen seguiu a regra: 0 (controle), 1x e 2x, onde nenhuma proteína foi adicionada ao primeiro microtubo (controle). No segundo microtubo foram adicionados 40 μL da mistura de proteínas DorperSPP-2 (1xP2), e em outro microtubo 80 μL desta mesma fração (2xP2). No quarto microtubo, foram adicionados 70 μL da proteína isolada DorperSPP-3 (1xP3) e no último microtubo, 140 μL desta mesma fração (2xP3).

Cada uma das soluções de microtubo foi embalada em seis palhetas de 250 μL , contendo aproximadamente 20 milhões de espermatozoides viáveis em cada palheta como ilustrado na Figura 3. Após a adição de proteínas DorperSPP ao sêmen equino, o conteúdo final dessas proteínas nas amostras foi de 0,016 g/dL^{-1} (tubo 1xP2), 0,033 g/dL^{-1} (tubo 2xP2), 0,018 g/dL^{-1} (tubo 1xP3) e 0,036 g/dL^{-1} (tubo 2xP3). As palhetas foram então refrigeradas a 5 ° C por 20 min. Após o resfriamento, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido em posição horizontal a uma distância de 4 cm da superfície do líquido por 15min. Após esse procedimento, todas as palhetas foram imersas simultaneamente em nitrogênio líquido e, a seguir, armazenadas em cilindro criogênico na presença de nitrogênio líquido por 35 dias.

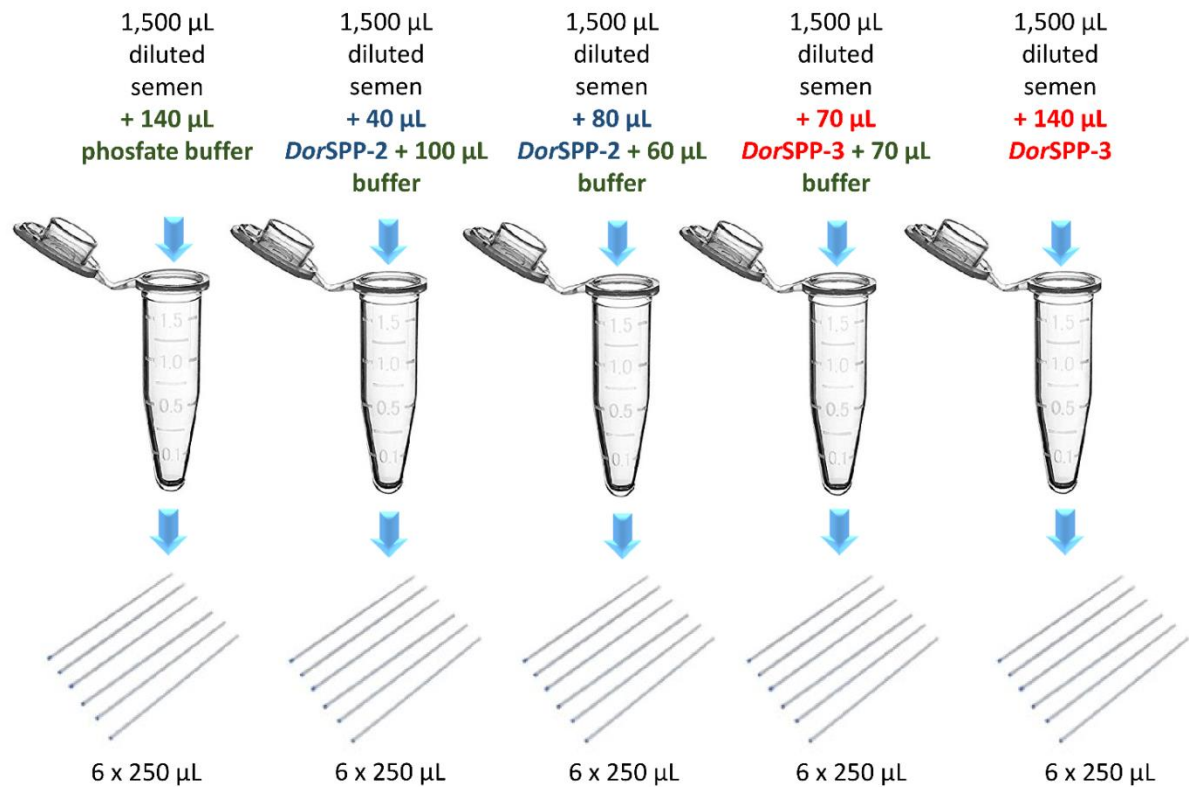


Figura 3. Projeto experimental para adição das proteínas DorperSPP-2 e DorperSPP-3 ao sêmen de cavalo e armazenamento.

5.5 Descongelamento do Sêmen

Decorridos 35 dias de estocagem em nitrogênio líquido, as palhetas de cada tratamento (6 palhetas), foram descongeladas em banho maria a 37°C/30seg e avaliadas no sistema automatizado CASA.

5.6 Análise da viabilidade espermática pós descongelamento

A análise computadorizada foi realizada no centro de pesquisa da Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM/Maringá, com a utilização do sistema automatizado Computer Assisted Semen Analysis (CASA) para avaliações seminais pós-descongelamento, usando o software AndroVision™ (Minitüb®, Tiefenbach, Alemanha), que visualiza, digitaliza e analisa imagens de espermatozoides sucessivas, fornecendo assim informações precisas e significativas sobre a cinética celular individual bem como valores estatísticos resumidos da população global.

Imediatamente após o descongelamento, uma amostra de 3 µL foi retirada de cada palheta para avaliação CASA. Uma câmara de leitura (contagem padrão Leja™, SC20.01.FA,

20 μ) foi usada, e três campos distintos de cada amostra foram automaticamente registrados e avaliados através do microscópio e sistema de computador. Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade curvilínea, (VCL; $\mu\text{m} / \text{s}$), velocidade em linha reta (VSL; $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), velocidade média do caminho (VAP; $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), distância curvilínea (DCL; μm), distância reta (DSL; μm), distância média percorrida (DAP; μm), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm), frequência de batimento cruzado (BCF; Hz), oscilação (WOB; $[\text{VAP} / \text{VCL}] \times 100$) e linearidade (LIN; $[\text{VSL} / \text{VCL}] \times 100$). Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.4, versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC), utilizando também o teste de tukey, com significância de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Cromatografia de filtração em gel

A separação das proteínas do plasma seminal foi realizada por etapas consecutivas de cromatografia de filtração em gel. Primeiro em Sephadex G25 (Figura 4-A), em seguida, Sephacryl S200 (Figura 4-B) onde as proteínas correspondentes aos picos DorperSPP-1, DorperSPP-2 e frações DorperSPP-3 (Figura 4-B) foram colhidos separadamente.

Na figura 4-A, 200 μL de plasma seminal de carneiros Dorper eluídos em sephadex G25 visando a identificação do pico contendo todas as frações protéicas. Este pico foi coletado separadamente, concentrado e inserido em uma coluna preenchida com Superdex S-200 (B). As frações proteicas relativas aos três picos identificados neste cromatograma foram coletadas separadamente. Em seguida, a fração DorperSPP-3 foi colhida e purificada em uma coluna Superdex S-200 10/300 (C). O gráfico em (D) mostra o conjunto de dados de calibração usado para calcular o peso molecular das proteínas DorperSPP. 500 μL da mistura de proteínas de pesos moleculares conhecidos (pontos pretos) foram aplicados: Ferritina (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Canalbumina (75 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa) em Superdex Coluna -200 10/300. Os volumes de eluição dos pontos pretos e DorperSPP-3 (ponto azul) foram convertidos em K_{av} e representados graficamente contra seus pesos moleculares. O peso molecular de DorperSPP-3 foi calculado por ajuste linear. O fluxo de eluição foi de 0,5 $\text{mL}/\text{min}^{-1}$ a 23 ° C.

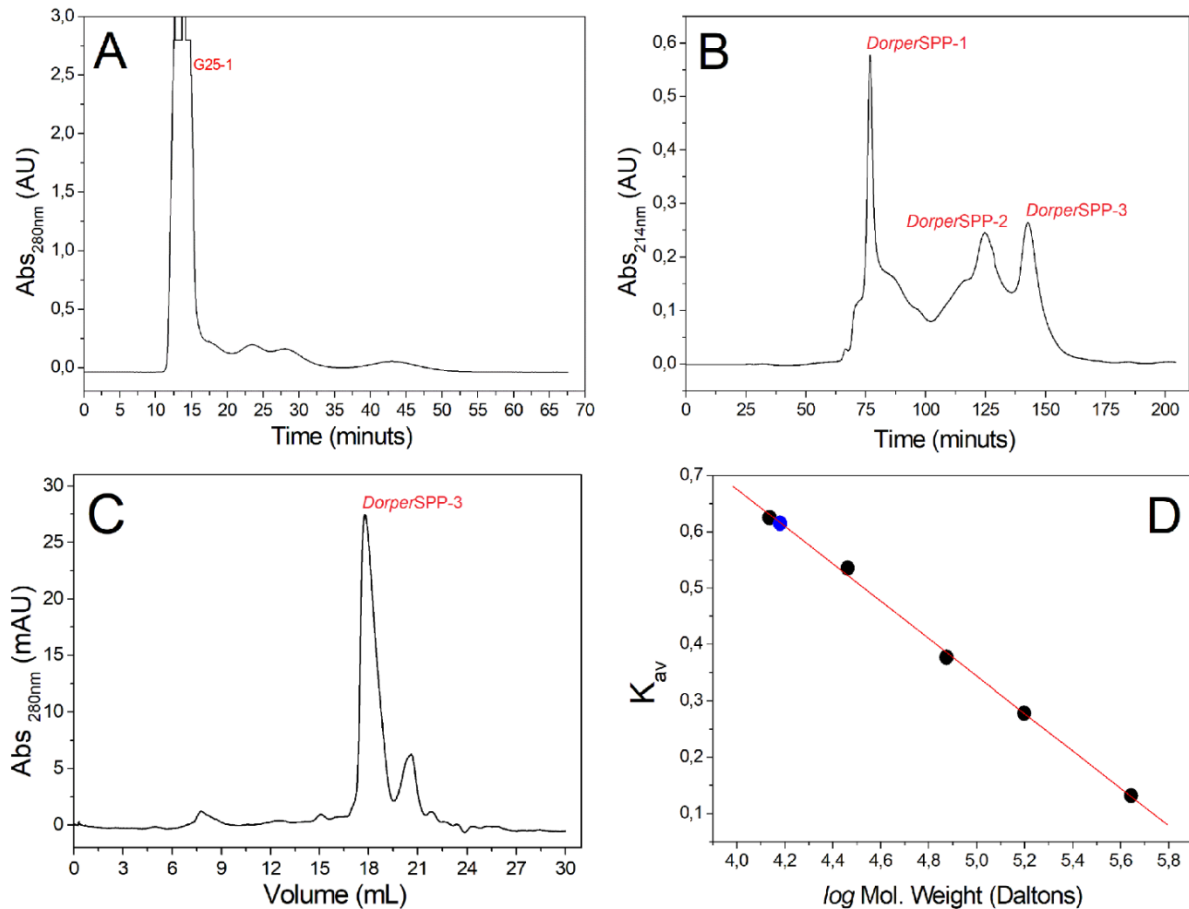


Figura 4. Cromatogramas de eluição obtidos pela passagem de amostras por diferentes colunas de filtração em gel. (A) Plasma seminal ovino passado em coluna sephadex G25; (B) Pico de eluição de coluna sephadex G-25 passado em coluna Superdex S-200; (C) Fração DorperSPP-3 coletada e purificada em uma coluna Superdex S-200 10/300; (D) Conjunto de dados de calibração usado para calcular o peso molecular das proteínas DorperSPP.

Os picos de eluição iniciais em torno da fração DorperSPP-1 continham todas as proteínas com peso molecular maior que 20 kDa, portanto essas proteínas não foram utilizadas em nossos ensaios devido as espermadesinas possuírem peso menor. As frações DorperSPP-2 e DorperSPP-3 foram filtradas separadamente na coluna Superdex S200-10 / 300, onde DorperSPP-2 mostrou ser formado por várias subfrações, sendo as principais denominadas DorperSPP-2D e DorperSPP-2E (Figura 4 e Figura 5).

O resultado (Figura 5) sugere que esta fração pode ser composta por 8 proteínas de diferentes pesos moleculares, no mínimo. Os pesos moleculares estimados para os componentes principais DorperSPP-2D (ponto azul) e DorperSPP-2E (ponto verde) foram 33,0 e 18,5 kDa, respectivamente. Uma vez que a eletroforese SDS-PAGE da fração DorperSPP-2D não mostrou nenhuma banda com um peso molecular próximo a 33 kDa, a interpretação mais provável é que

esta proteína seja um homodímero em sua unidade biológica que seria formada por duas subunidades de ~ 16,5 kDa.

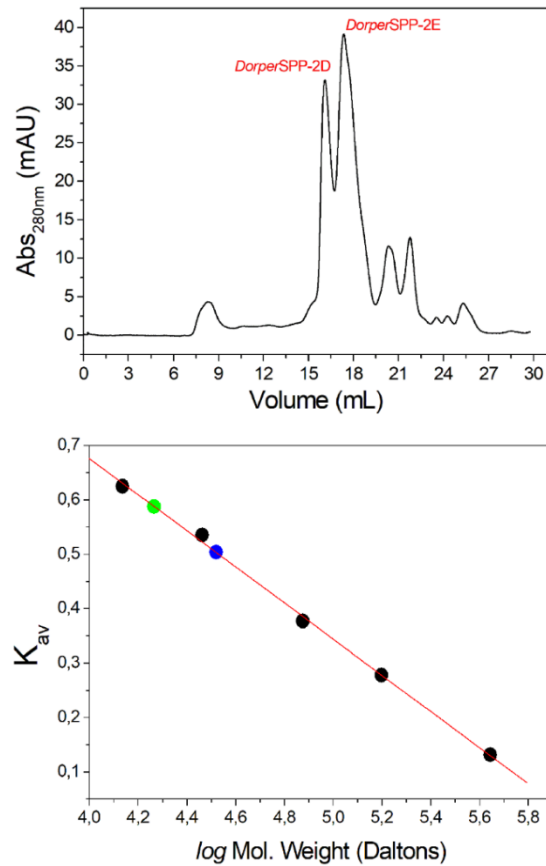


Figura 5. Cromatograma mostrando a eluição da fração DorperSPP-2 através da coluna Superdex S200-10 / 300.

Após a separação cromatográfica, as frações DorperSPP-2 (mistura de proteínas) e DorperSPP-3 foram concentradas em ~ 0,64 g/dL⁻¹ (6,4 mg/mL⁻¹) e ~ 0,46 g/dL⁻¹ (4,6 mg/mL⁻¹), respectivamente, para uso em ensaios subsequentes. Assim, DorperSPP-3 é proporcionalmente o principal componente do plasma seminal de carneiros Dorper.

6.2 Validação da purificação de proteínas do plasma seminal de carneiro

Após a separação do plasma por centrifugação, as amostras foram misturadas para se obter um *pool* de plasma. As frações de proteína presentes neste *pool* são mostradas na Figura 6.

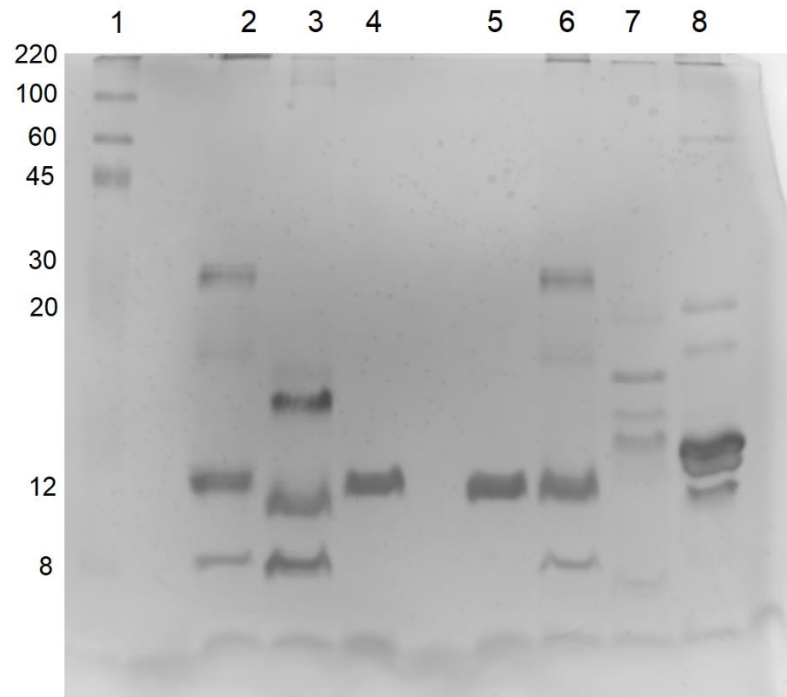


Figura 6. SDS-PAGE corado com prata 15%. A pista 1 contém o marcador ColorBurst C1992 Sigma®. Pool de plasma seminal Carneiro Dorper (pistas 2 e 6); DorperSPP-3 purificado em duas concentrações diferentes (pistas 4 e 5); DorperSPP-2 (pista 3); plasma seminal de cavalo (pista 7) e plasma seminal de touro (pista 8).

Os principais componentes do plasma seminal de carneiros Dorper correspondem a proteínas com peso molecular variando entre ~ 12 a ~ 30 kDa (Fig. 6), um resultado semelhante ao observado em carneiros Texel (SOUZA et al., 2012; BERGERON et al., 2005; CONDESSA et al., 2018). A literatura relata que as proteínas dentro dessa faixa de massa pertencem ao grupo das espermadesinas e proteínas que contêm os domínios da fibronectina tipo II (BERGERON et al., 2005).

O fato de o sêmen de uma determinada espécie congelar melhor do que de outra e tem a ver com a tecnologia disponível, entretanto, o papel das proteínas de baixo peso molecular no plasma seminal em uma eventual melhora da viabilidade espermática pós-descongelamento foi investigado neste trabalho. Assim, optou-se por purificar as proteínas de baixo MW (entre 12 e 18 kDa) do sêmen ovino, devido à alta expressão dessas proteínas nesta espécie.

6.3 Criopreservação de sêmen equino tratado

As análises dos parâmetros de viabilidade do sêmen descongelado que recebeu a mistura de proteínas DorperSPP-2 são mostradas na Figura 7 e Tabela 1. Considerando um erro de 5%, não foram observadas alterações significativas na maioria dos parâmetros avaliados. A Tabela

1 mostra as variações obtidas para cada parâmetro avaliado pelo CASA para as duas condições de tratamento utilizando a mistura de proteínas DorperSPP-2. Dos 12 parâmetros avaliados, apenas VCL, VSL e VAP mudam de forma significativa ($p > 0,05$).

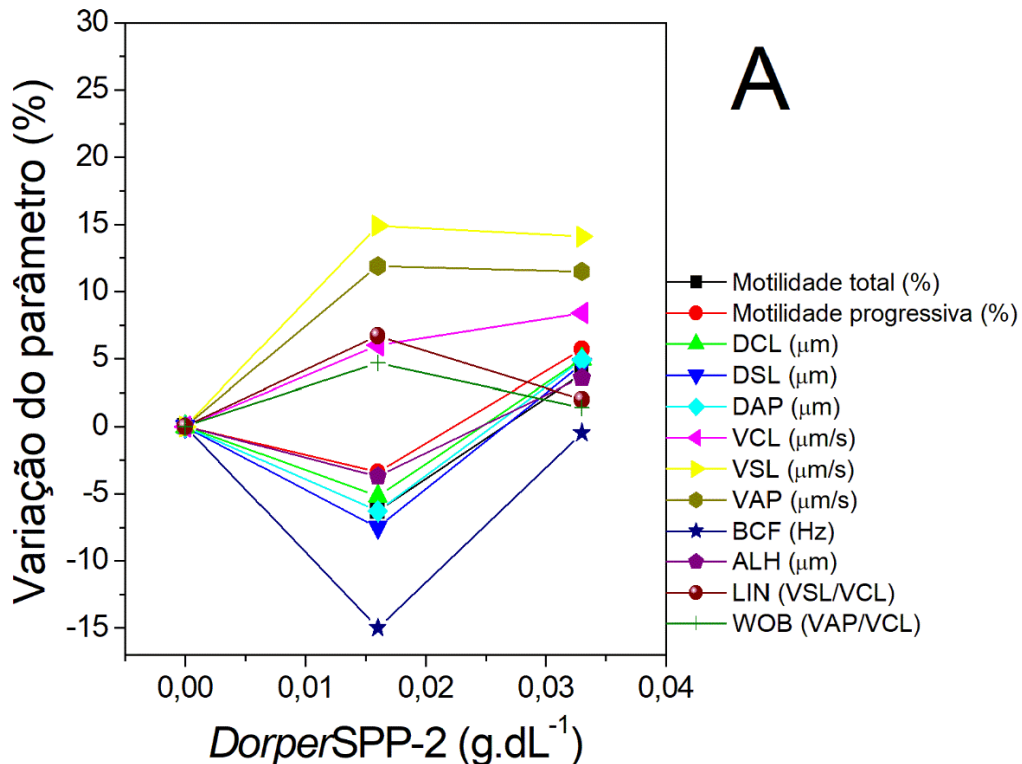


Figura 7. Parâmetros de viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas para a mistura da proteína DorperSPP-2. Cada ponto no gráfico representa a classificação média de seis palhetas descongeladas de três ganhões diferentes.

As análises dos parâmetros de viabilidade do espermatozoide para o sêmen descongelado que recebeu a mistura de proteínas DorperSPP-3 são mostradas na Figura 8 e Tabela 2. A Tabela 2 apresenta os dados de viabilidade espermática obtidos pelo CASA a partir do sêmen descongelado que foi previamente tratado com a proteína DorperSPP-3. Na concentração de 1x, verificou-se que, dos 12 parâmetros avaliados, 10 apresentaram melhora em relação ao grupo controle, enquanto na concentração 2x, 11 parâmetros apresentaram resultados melhores que o grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 1. Variações (médias) obtidas a partir dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das condições de ensaio (negrito) para sêmen tratado com a mistura de proteínas DorperSPP-2.

Parâmetros	Condição/tratamento
------------	---------------------

	0x	1x	% relativa	2x	% relativa
Motilidade total (%)	18,7	18,3	-6,3	17,4	9,8
Motilidade progressiva (%)	13,6	13,9	-3,4	12,5	7,7
DCL (mm)	25,0	23,9	-5,2	23,9	14,2
DSL (mm)	12,7	12,4	-7,5	12,8	5,9
DAP (mm)	14,6	14,2	-6,3	14,4	7,4
VCL (mm·s ⁻¹)	19,9	21,0	6,0	21,5	16,2
VSL (mm·s ⁻¹)	9,6	11,1	14,9	11,0	12,3
VAP (mm·s ⁻¹)	11,4	12,9	11,9	12,9	12,6
BCF (Hz)	1,4	1,1	-15,0	1,4	-4,2
ALH (mm)	2,5	2,6	-3,7	2,4	0,4
LIN (VSL/VCL)	0,5	0,6	6,7	0,6	2,6
WOB (VAP/VCL)	0,6	0,6	4,7	0,6	2,0

A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição (1x ou 2x) mudou em relação ao controle (0). Valores positivos indicam melhora, enquanto valores negativos indicam piora.

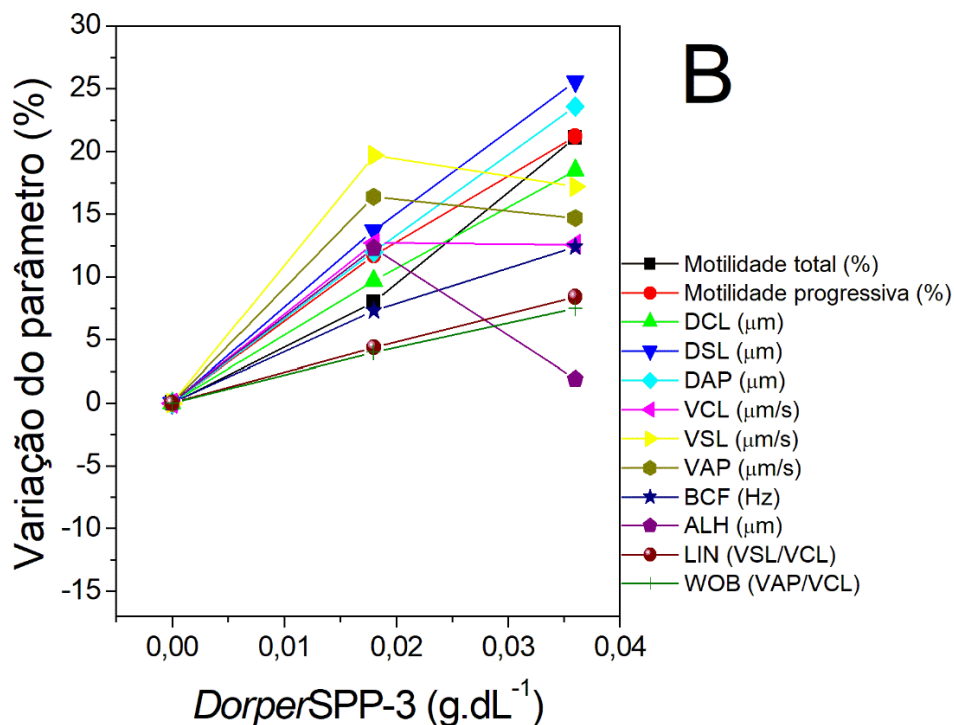


Figura 8. Parâmetros de viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas para a mistura da proteína isolada DorperSPP-3. Cada ponto no gráfico representa a classificação média de seis palhetas descongeladas de três ganhões diferentes.

Tabela 2. Variações (médias) obtidas a partir dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das condições de ensaio (negrito) para sêmen tratado com a mistura de proteínas DorperSPP-3. A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição (1x ou 2x) mudou em relação ao controle (0). Valores positivos indicam melhora, enquanto valores negativos indicam piora.

Parâmetros	Condição/tratamento				
	0x	1x	% relativa	2x	% relativa
Motilidade Total (%)	18,7	19,3	8,0	19,3	21,1
Motilidade Progressiva (%)	13,6	14,4	11,7	13,8	21,2
DCL (mm)	25,0	26,7	9,7	31,4	18,5
DSL (mm)	12,7	14,4	13,7	19,6	25,6
DAP (mm)	14,6	16,2	12,0	21,3	23,6
VCL (mm·s ⁻¹)	19,9	22,4	12,7	22,1	12,6
VSL (mm·s ⁻¹)	9,6	11,5	19,7	11,4	17,2
VAP (mm·s ⁻¹)	11,4	13,4	16,4	13,3	14,7
BCF (Hz)	1,4	1,4	7,3	1,5	12,4
ALH (mm)	2,5	2,9	12,3	2,2	1,9
LIN (VSL/VCL)	0,5	0,6	4,4	0,6	8,4
WOB (VAP/VCL)	0,6	0,6	4,0	0,6	7,5

Os resultados deste tratamento indicam que onze parâmetros mostraram melhora significativa em relação ao grupo controle de uma maneira dependente da concentração (Figura 4). São eles: motilidade total, motilidade progressiva, linha curva de distância (DCL), linha reta de distância (DSL), caminho médio de distância (DAP), frequência de batimento cruzado (BCF), linearidade (LIN) e oscilação (WOB). Os parâmetros velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do caminho (VAP) também apresentaram melhora, mas não de forma dependente da concentração. O mesmo padrão de comportamento também foi observado no tratamento com a fração DorperSPP-2 (Tabela 1). Há uma relação positiva entre os valores de VAP, VSL e VCL e as taxas de fertilidade, sem alteração dos valores de ALH.

7. DISCUSSÃO

De uma forma geral, o perfil eletroforético do plasma seminal de carneiros e touros expressam maiores quantidades de proteínas de baixo peso molecular (DRUART et al., 2013) (Figura 6). No entanto, essa analogia se refere à quantidade de proteína expressa e não à natureza e diversidade dessas proteínas. Coincidentemente ou não, carneiros e touros são considerados “good coolers” e seu sêmen congelado apresenta maior viabilidade após o descongelamento em relação ao de cavalos, que apresentam menor quantidade de expressão dessas proteínas (AMANN e PICKETT, 1987; DRUART et al., 2013) (Figura 6).

É interessante notar que proteínas com peso molecular de ~ 12 a ~ 18 kDa seriam praticamente inseparáveis pelo método de filtração em gel usado porque suas massas

moleculares são muito próximas. No entanto, uma vez que as condições de filtração em gel utilizadas permitem que proteínas maiores eluam primeiro, tornou-se evidente que a proteína contida na fração DorperSPP-2D (Figura 5) pode ter se reunido em unidades maiores como homodímeros, o que lhes permitiu eluir separadamente de DorperSPP-2E. Na verdade, a fração DorperSPP-2 mostrou ter várias subfrações após passar pela coluna Superdex S200-10 / 300 (Figura 5), onde alguns dos principais componentes tinham pesos moleculares acima de 18,4 kDa, um dos sendo eles compatíveis com um dímero.

Após purificação e concentração dessas frações proteicas, elas foram utilizadas em ensaios de criopreservação de sêmen. Sendo esse sêmen acrescido de um diluente de transporte para centrifugação, e além disso, o fato desse sêmen ter sido previamente centrifugado para retirada do sobrenadante ocasionou a retirada da maior parte das proteínas do plasma seminal no processo. A adição do segundo aditivo, o diluente de congelamento, diluiu ainda mais o já baixo teor de proteína que poderia ter permanecido. Portanto, o baixíssimo teor de proteínas do plasma seminal que permaneceu na amostra contribuiu para tornar mais proeminente o efeito das proteínas adicionadas.

Nos experimentos de criopreservação realizados neste presente trabalho, usou-se sêmen de três garanhões diferentes. Como o sêmen de diferentes animais pode apresentar propriedades diferentes que refletem em oscilações nos valores dos parâmetros CASA, optou-se por apresentar os dados de cada parâmetro CASA como porcentagens de mudanças, além dos valores absolutos. Essa foi a forma encontrada para normalizar os valores e permitir uma análise comparativa dos resultados.

Ao considerar a motilidade, pode ser visto a partir dos dados que a adição da mistura de proteínas DorperSPP-2 não promove melhora significativa. Apenas os parâmetros relacionados à velocidade do espermatozoide (VCL, VSL e VAP) apresentaram tendência de melhora, porém, como esse comportamento foi observado nos dois tratamentos com as frações, não atribuímos isso às proteínas adicionadas. Com base nesses resultados, a adição de proteínas contidas na fração parcialmente purificada de DorperSPP-2, cujos principais componentes proteicos possuem peso molecular de 16,5 e 18,5 kDa, não afeta a viabilidade espermática pós-descongelamento (Figura 4 e Tabela 1).

A Figura 8 representa a avaliação da viabilidade do espermatozoide para sêmen descongelado que recebeu a proteína DorperSPP-3 purificada. Observou-se melhora em todos os parâmetros

avaliados, exceto ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça), porém, este parâmetro praticamente não mudou com nenhum dos tratamentos.

A adição de uma concentração mais elevada (2x) da proteína DorperSPP-3 teve claramente um efeito de melhoria na motilidade dos espermatozoides em 21% e em 22,5% considerando a média dos parâmetros DCL, DSL e DAP. Ou seja, a presença da proteína DorperSPP-3 até o limite de concentração utilizado neste trabalho influenciou positivamente os principais parâmetros espermáticos.

Estudos de análise proteômica (BARRIOS et al., 2000) e caracterização bioquímica (BARRIOS, 2005) do plasma seminal de carneiros europeus Aragonese Rasa mostraram que a suplementação de sêmen com duas proteínas de baixo peso molecular (14 e 20 kDa) de sua própria espécie evitou danos à membrana da célula espermática causada por choque frio durante a congelação. Ele ainda reverte os danos de congelação dos espermatozoides sem tratamento prévio. Evidências desse tipo de proteção já haviam sido relatadas por nosso grupo de pesquisa por meio de simulações computacionais e estudos de desnaturação térmica de espermadesinas de carneiros de Texel (CONDESSA et al., 2018).

Um trabalho também realizado investigando potencial de dois tipos de proteínas seminais (BSPs) denominados BSP1 e BSP5 do plasma seminal de carneiro para prevenir danos associados a congelação, aos parâmetros funcionais dos espermatozoides de carneiros (PINI et al., 2018). Seus resultados sugerem que a suplementação pré-congelamento de BSPs tem potencial para efeitos positivos sobre aspectos da motilidade pós-descongelamento dos espermatozoides ovinos, embora os autores não sequenciem essas proteínas, em seus resultados.

Uma vez que o uso da proteína DorperSPP-3 sozinha forneceu viabilidade espermática pós-descongelamento melhorada em comparação com as proteínas contidas na fração DorperSPP-2, foi justificado que as análises estruturais e biofísicas subsequentes se concentraram apenas na proteína DorperSPP-3.

Estudo realizado por Vasquez et al. (2019), mostrou que o plasma seminal de ovinos pode reduzir os danos causados pela congelação e descongelação, pois compararam sêmen ovino congelado com e sem o plasma seminal, com a adição de dois meios diluentes diferentes. Além disso, afirmaram que os danos podem ser aumentados quando na presença de extensor, principalmente a base de gema de ovo.

Trabalho recente demonstrou que uma proteína produzida pela vesícula seminal de camundongos (SPINK3), quando adicionada ao sêmen de carneiro pós descongelação melhora parâmetros seminais destes, principalmente a motilidade total e progressiva (ZALAZAR et al., 2020). Tendo efeito sobre a membrana plasmática do espermatozoide, causando a estabilização da mesma.

O plasma seminal de garanhões considerados “*good coolers*” ou “*bad coolers*”, quando adicionado ao sêmen antes da congelação não proporcionou um efeito adicional nos parâmetros espermáticos de espermatozoides de garanhões (ESSAWE, 2019), mas espermatozoides de epidídimo quando encubados antes da congelação em plasma seminal (VIEIRA et al., 2020) ou a utilização de proteínas com ligação ou não a heparina (BUBENICOKVA et al., 2020), tiveram resultados melhores quando comparados ao grupo controle, confirmando assim que existe muita variação dentro da espécie, e assim a adição de proteínas seminais de outras espécies pode ser benéfico.

A motilidade espermática ainda é um parâmetro importante para avaliar a qualidade do sêmen em garanhões (VARNER, 2008; LOVE et al., 2015). Quando se avalia em neste presente experimento a adição da proteína DorperSPP-3, melhorou a motilidade total e progressiva em mais de 20%, quando compara-se ao grupo controle, pois o papel da espermadesina é se ligar a superfície espermática (CABALLERO et al., 2009).

8. CONCLUSÕES

Os principais componentes do plasma seminal dos carneiros Dorper na faixa de 10 a 20 kDa correspondem a três proteínas. Seus pesos moleculares estão entre 15,1 e 18,5 kDa, e foram separados com sucesso por cromatografia de filtração em gel.

A adição da proteína DorperSPP-3 purificada ao sêmen de garanhão antes da congelação até a concentração de 0,036 g/dL⁻¹ promoveu um efeito estimulante sobre os principais parâmetros avaliados pelo CASA, linearmente de forma dependente da concentração até o limite das concentrações utilizadas nestes ensaios.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., NETO, C.R. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.81-85, 2017.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JR, J. The effect of breeds spermatic parameters over equine sêmen freezability. **Theriogenology**, v.54, p.29-136, 1999.

- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; RAMIRES NETO, C. Advances in stallion semen cryopreservation. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.32, p.521-530, 2016.
- AMANN, R. P; GRAHAM, J. K. **Spermatozoal function**. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine reproduction. Philadelphia: Saunders, p.715-745, 1993.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. 20ª ed., v. 1. São Paulo, SP, Brasil: Instituto FNP. 2019.
- BARRIOS, B.; PÉ R.P.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; BLANCO, T.M. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane1. **Biology of Reproduction**, p.63, p.1531–7, 2000.
- BARRIOS, B. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, v.26, p.539–49, 20005.
- 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.
- BUBENICKOVA, F.; POSTLEROVA, P.; SIMONIK, O.; SIROHI, J.; SICHTAR, J. Effect of Seminal Plasma Protein Fractions on Stallion Sperm Cryopreservation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.17, p.6415, 2020.
- CABALLERO, I.; VÁSQUEZ, J.M.; MAYOR, G.M.; ALMIÑANA, C.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. PSP-I/PSPII spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.32, p.505-513, 2009.
- CAJAZEIRAS, J. B. **Espermadesinas caprinas (bodesinas): produção em sistema bacteriano**. Tese (Doutorado). Universidade estadual do Ceará – Faculdade de Veterinária. Fortaleza. 2009.
- CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A. *et al.* Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bulls sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, v.65, p.1875-90, 2006.
- 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 2018.
- CONTRI, A., VALORZ, C., FAUSTINI, M., WEGHER, L. & CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, n.3, p.424-435, 2010.
- DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1200, n.1, p.48-54, 1994.
- DRUART, X; RICKARD, J.P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P.L.; YOUNG, C.M.K.; BATHGATE, R. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**, v.91, p.13–22, 2013.

- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MULLER, P.; TOPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 45-57, 2005.
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SINOWATZ, F.; WILKE, I.G.; WABERSKI, D.; TÖPFER-PETERSEN, E. Expression of spermadhesin genes in porcine 37 male and female reproductive tracts. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.32- 41, 2002.
- ESSAWE, E.A. **Equine seminal plasma: its role in protecting stallion spermatozoa during cryopreservation**. 2019. 90 f. Tese (Department of Clinical Sciences) Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Uppsala, 2019.
- GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.321-339, 2004.
- GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J. A. M.; MORENO, F. B.; ANDRADE, T. S.; SANTOS, A. C. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; MOURA, A. A. Seminal plasma protein of adults boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology**. v.82. p.697-707. 2014.
- GOULARTE, K. L.; GASTAL, R. S.; GONÇALVES, A. O.; SCHNEIDER, J. R.; CORCINI, C. D.; LUCIA, 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.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**., v.12, p.131-147, 1996.
- HENALUT, M.A.; KILLIAN, G.J.; KAVANAAUGH, J.F.; GRIL, L.C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of different fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free ovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.52, p.390–397, 1995
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2018 Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>> Acesso em 03 fev. 2020.
- JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n.6, p.11-19, 2009.
- KARESKOSKI M, KATILA T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.249-56, 2008.
- KNEIBL S. Cryopreservation of stallion semen: the influence of semen collection techniques, centrifugation, packing forms and methods of freezing on the motility and plasma membrane integrity of spermatozoa. **Hannover**, 1993.
- KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M. J.; MATTOS, R.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.318-319, 2001.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

- LOVE, C.C.; NOBLE, J.K.; STANDRIDGE, S.A.; BEARDEN, C.T.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; CAVINDER, C.A. The relationship between sperm quality in cool-shipped semen and embryo recovery rates in horses. **Theriogenology**, v.84,p. 1587-1593, 2015.
- LUNA, C.; COLÁS, C.; CASAO, A.; SERRANO, E.; DOMINGO, J.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRAIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm-zona pelúcida interaction. **Theriogenology**, v.83, p.670-678, 2015.
- MANJUNATH, P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in Bull seminal plasma. In: SAIRAM, M.R.; ATKINSON, L.E. (Eds.) Gonadal proteins and peptides and their biological significance. **Singapore: World Scientific**, p.49-61, 1984.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília. 2016.
- MARENGO, S. R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.52-63, 2008.
- MARIZ, T.M.A.; ANJOS, A.G.; FLOR, J.M.; FLOR, L.M.A.M.; LIMA, C.B.; GIVISIEZ, P.E.N.; AZEVEDO, P.S. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da raça Mangalarga Marchador no estado de Sergipe. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 2, p. 39-43, 2008.
- MAXWELL, W.M.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.11 65–11 78, 1996.
- MEDEIROS, A.S.L.; FERREIRA, H.N.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Índices de fertilidade de espermatozoides de garanhões submetidos ao estresse osmótico por diferentes crioprotetores. **Acta Scientiae. Veterinariae.**, v.3, p.35, 2007.
- MEDRANO, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**, v.41, p.246-250, 2009.
- MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; HAVT, A.; CUNHA, R.M.S.; MARTINS, D.B.G.; CASTELLETTI, C.H.M.; SOUZA, P.R.E.; LIMA FILHO, J.L.; FREITAS, V.J.F.; CAVADA, B.S.; BAPTISTA, G.R. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Molecular Reproduction And Development**, v.75, p.8-16, 2008.
- MONTECHIESI, D. F. Transferência de embriões em equinos e os fatores relacionados as taxas de prenhez. **Ciência Animal.**, v. 25, n. 1, p. 187-194, 2015.
- MORTIMER, S.T., MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v.1 27, p.285–291, 2004.
- MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.139-144, 2011.
- MOURA, T.C.M. **Uso de sacarose como suplemento em diluidor para criopreservação de sêmen de garanhões**. 2017. 59 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017

- NASCIMENTO, A. S. F.; CAJAZEIRAS, J. B.; NASCIMENTO, K. S.; NOGUEIRA, J. M. S.; SOUZA, B. L.; TEIXEIRA, E. H.; MELO, L. M.; CUNHA, R. M. S.; SILVA, A. L. C.; CAVADA, B. S. Expression, purification and structural analysis of recombinant rBdh-2His, a spermadhesin from buck (*Capra hircus*) seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**. v.24. p.580-587, 2012.
- 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.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6° ed. Porto Alegre: Artmed, p.89-92. 2014.
- OLIVEIRA, G. C., OLIVEIRA, B., CELEGHINI, E. C. C., FERNANDES, C. B. & MATTOS, C. B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.37, n.1, p.23-28, 2013.
- PAPA, F. O., ALVARENGA, M. A., DELL'QUA, J. & MONTEIRO, G. M. **Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino**. São Paulo, São Paulo, Brasil: Botupharma, 2007.
- PARADIS, M. Demographics of health and disease in the geriatric horse. **Veterinary Clinics of North America -Equine Practice**, p.391–401, 2002.
- PINI, T.; FARMER, K.; DRUART, X.; GOMES, A.P.T.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; LEAHY, T.; GRAAF, S.P. Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Cryobiology**, v. 82, p.78–87, 2018.
- RÊGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; BURNS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**. v.148, n.2, p.1-17, 2014.
- REINERT, M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MANN, K; TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **European Journal of Biochemistry**, v.242, p.636-640, 1996.
- RICKARD, J. P.; LEAHY, T.; SOLEIHAVOUP, 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**, v.3, n.126, p.303-311, 2015.
- ROMERO, A.; ROMAO, M.J.; VARELA, P.F.; KOLLN, I.; DIAS, J.M.; CARVALHO, A.L.; SANZ, L. TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.4, p.783-788, 1997.
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V. F. M.H.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir Brazilian. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36 n.2, 1999.
- SALVADOR, D.F; SALVADOR, S.C. Biomarcadores reprodutivos no proteoma do sêmen de touros. **Pubvet**, v.13, n.10, p.1-12, 2019.
- 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 Letters**, 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.12, p.21-31, 1993.

SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.276-292, 2008.

SOLEIHAVOUP, 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, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; 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. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, v.75, p.4436-4456, 2012.

SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; 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. 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. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.6175-6179, 2000.

TEIXEIRA, D.I.A.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H.; HAVT, A; BLOCH JUNIOR, 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.F. Isolation and partial characterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. **Protein & Peptide Letters**, v.9, p.331-335, 2002.

TÖPFER-PETERSEN, E. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.159-170, 2004.

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

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.

VASQUEZ, R.R.; CESARI, A.; GRECO, M.B.; CANO, A.; HOZBOR, F. Extenders modify the seminal plasma ability to minimize freeze-thaw damage on ram sperm. **Reproduction in domestic animals**, v.00, p.1–9, 2019.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.

VIEIRA, L.A.; MATÁS, C.; TORRECILLAS, A.; SAEZ, F.; GADEA, J.; Seminal plasma components from fertile stallions involved in the epididymal sperm freezability. **Andrology**, 2020.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreservation 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.

WOODS, J., BERGFELT, D. R. & GINTHER, O. J. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.22, n.6, p.410-415, 1990.

ZALAZAR, L.; CUERDA, M.I.; AJOFRÍN, I.S.; GARDE, J.J.; VALLS, A.J.S.; CESARI, A. Recombinant SPINK3 improves ram sperm quality and in vitro fertility after cryopreservation. **Theriogenology**, v.144, p.45-55, 2020.

06/01/2021

Email – Luan Sitó – Outlook

Please verify your contribution to Structural, functional and biophysical characterization of the major proteins from the seminal plasma of Dorper rams and their effects on stallion semen cryopreservation

Theriogenology <em@editorialmanager.com>

Ter, 05/01/2021 15:43

Para: Luan Sitó da Silva <luan-sito08@hotmail.com>

This is an automated message.

Journal: Theriogenology

Title: Structural, functional and biophysical characterization of the major proteins from the seminal plasma of Dorper rams and their effects on stallion semen cryopreservation

Corresponding Author: Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

Co-Authors: Luan Sitó da Silva, Bachelor; Maycon Araújo Ruivo, Master; Tainá Michelle da Cruz, Technologist; Jean Eduardo Meneguello, Master; Eduardo Jorge Pilau, Ph.D.; Ícaro Putinhon Caruso, Ph.D.; Gentil Vanini Moraes, Ph.D.; Antônio Campanha Martinez, Ph.D.

Manuscript Number: THERIO-D-20-01213R1

Dear da Silva,

Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission.

Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship: <https://www.editorialmanager.com/therio/l.asp?i=207965&l=JY2A1AT6>

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in at <https://www.editorialmanager.com/therio/>

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at favseixas@uem.br; favseixas@gmail.com

Thank you,
Theriogenology

More information and support

FAQ: What is Editorial Manager Co-Author registration?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/kw/co-author+editorial+manager/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub:

<https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site:

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AQqKADAwATZiZmYAZC1hNDEzLWlzMdUfMDACLTAwCgAQAHPClI8j8%2FFOsWUvIwDMAB8%3D>

1/2

PARTE II – ARTIGO CIENTÍFICO

Espermadesina Ovina na Criopreservação de Sêmen Equino

Luan Sitó da Silva¹, Gentil Vanini de Moraes¹, Antônio Campanha Martinez¹, Flavio Augusto Vicente Seixas²

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.

RESUMO

A equinocultura no Brasil vem se fortalecendo, ao longo dos anos, assim como atividade pecuária, sendo uma das biotecnologias que ainda é muito aplicada é a inseminação artificial, por isso a correta colheita e manipulação do sêmen são essenciais para o sucesso da técnica, podendo ser utilizado o sêmen fresco, fresco resfriado ou congelado. Os principais componentes do plasma seminal de carneiros Dorper correspondem a proteínas com peso molecular variando entre ~ 12 e ~ 18 kDa, pertencentes ao grupo das espermadesinas e proteínas contendo domínios de fibronectina tipo II. É sabido que o sêmen de garanhões não apresenta boa congelabilidade, tendo grande variação dentro da própria espécie. Assim objetivo foi avaliar o efeito da proteína majoritária do sêmen de carneiros da raça Dorper no diluente seminal para congelação de sêmen equino. O plasma seminal de 14 ovinos de aproximadamente 12 meses de idade foi separado por centrifugação e as proteínas separadas por meio de cromatografia de filtração em gel, e a pureza das amostras foi verificada por meio de eletroforese. Após a purificação de duas frações proteicas de peso molecular de aproximadamente 15,1 e 18,5 kDa, essas foram adicionadas ao diluente seminal de congelação de três garanhões da raça quarto de milha, nas proporções de 0, 1x e 2x, sendo as amostras congeladas em nitrogênio líquido até a análise por sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Após a descongelação foi verificado que a adição da fração dois melhorou somente três parâmetros seminais avaliados pelo CASA dos 12 avaliados, já a fração três da proteína melhorou 11 parâmetros dos 12 estudados. Concluindo assim que a adição da fração DorperSPP-2 contendo proteínas parcialmente purificadas de plasma seminal de carneiros Dorper ao sêmen de cavalo antes do congelamento não influenciou significativamente os parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema CASA. A adição da proteína DorperSPP-3 purificada ao sêmen de cavalo antes do congelamento até a concentração de 0,036 g/dL⁻¹ promoveu um efeito estimulante sobre os principais parâmetros avaliados pelo CASA, linearmente de forma dependente da concentração até o limite das concentrações utilizadas nestes ensaios.

Palavras-chave: cavalo; espermadesina; ovino, reprodução animal.

1. Introdução

As espermadesinas formam uma família de proteínas encontradas no plasma seminal de alguns mamíferos e são descritas em carneiros, garanhões, touros e porcos (DRUART et al., 2013). Essas proteínas têm pesos moleculares (MW) que variam de 12 a 16 kDa e são produzidas pelo epidídimo e, em sua maioria, pela vesícula seminal. Sua concentração no líquido seminal pode variar entre 0,6 e 7,0 mg/mL⁻¹, constituindo o principal componente protéico do suíno (RHODES et al., 2005).

A comparação proteômica do plasma seminal das espécies mais comuns de animais domésticos mostrou perfis de proteínas muito distintos. Isso se deve principalmente às diferenças na contribuição relativa das glândulas sexuais acessórias (DRUART et al., 2013). Entre as proteínas com maior variabilidade no plasma seminal de espécies de ungulados, as proteínas de baixo peso molecular (14–15 kDa) são aquelas em maior concentração, sendo os principais componentes proteicos no plasma seminal de carneiros (CONDESSA et al., 2018) e suínos (PETERSON et al., 2005; PETERSEN e CALVETE, 1998). No sêmen equino, as quantidades dessas proteínas de baixo peso molecular são muito menores do que em outras espécies domésticas (DRUART et al., 2013; REINERT et al., 1996).

A inseminação artificial é uma das biotecnologias de melhoramento de maior interesse agrícola e pode ser realizada por meio de sêmen fresco diluído, diluído-transportado, diluído-resfriado-transportado, bem como congelado (LOOMIS, 2001). O sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado é visto em espécies como bovinos e carneiros. Existem vários estudos que demonstram o sucesso da técnica de uso de sêmen congelado em bovinos, onde as taxas de prenhez observadas estão em torno de 62% (SAHA ET AL., 2014), bem como em carneiros, onde as taxas de prenhez variam entre 40 e 70% (GIL, 2003, FUKUI et al., 2008; HISAWA et al., 2009). Em ambas as espécies (bovinos e carneiros), as taxas obtidas por inseminação artificial com sêmen congelado são satisfatórias, enquanto em equinos essas taxas são muito variáveis, geralmente variando entre 25 e 50% (BARBACINI et al., 2005; HOFFMANN et al., 2011).

As maiores quantidades de proteínas variando de 12 a 18 kDa no plasma seminal de carneiros em comparação com os de cavalos, bem como a maior viabilidade espermática pós-descongelamento em carneiros em comparação com os cavalos, associada ao papel protetor das espermadesinas no acrossomo de espermatozoides assim como os atributos funcionais das

proteínas do plasma seminal de carneiros, nos levaram a investigar as propriedades funcionais, estruturais e biofísicas de proteínas com peso molecular variando de 12 a 18 kDa isoladas de plasma seminal de carneiros Dorper.

Assim, o objetivo deste trabalho foi purificar as proteínas do plasma seminal de carneiros Dorper com peso molecular entre 12 a 18 kDa e avaliar se elas podem exercer papel crioprotetor no sêmen equino após o descongelamento. Uma melhor compreensão da estrutura e propriedades dessas proteínas pode ajudar a desenvolver protocolos de congelamento de sêmen mais eficientes que podem fornecer maior viabilidade do esperma após o descongelamento por períodos mais longos de tempo e podem fazer uma contribuição biotecnológica direta para um mercado que movimenta milhões de dólares por ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita de sêmen ovino

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA / UEM) sob o protocolo nº 2253120516, em atendimento à Lei 11794/2008.

Amostras de plasma seminal foram colhidas de 14 carneiros (uma amostra por animal), da raça Dorper de aproximadamente 12 meses de idade de uma mesma propriedade de ovinos parceira do Laboratório de Criação e Reprodução Animal – UEM, Campus Umuarama, por meio de eletroejaculação.

Após a colheita, o sêmen foi acondicionado em recipiente apropriado (microtubo de centrifugação) para então ser realizada a centrifugação e obtenção das amostras do plasma que foi separado ainda na propriedade, por centrifugação a 670 G por 10min em centrífuga clínica (Metroterm®) e, em seguida misturados para formar um pool plasmático DE APROXIMADAMENTE X ML. Foi adicionado a esta mistura 5 mL de inibidor de protease P9599 (Sigma®) para evitar degradação da amostra.

2.2 Purificação da espermedesina

A purificação das proteínas foi realizada no Laboratório de Bioquímica Estrutural do departamento de Bioquímica da UEM - Campus CTC. O volume de 200µL plasma seminal ovino colhido foi inserido em uma coluna cromatográfica de 27 ´ 1,5 cm (altura ´ 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

cromatógrafo Akta Pure-M (GE Life Sciences®). Os picos de eluição correspondentes foram concentrados com as diferentes proteínas coletadas separadamente, com a utilização de concentradores Amicon 10.000 MWCO (Millipore®) a 4°C em centrífuga (Sigma® 3k30). A fração eluída que continha as proteínas de interesse foi concentrada e 100µL inseridos 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. Sucessivas cromatografias foram realizadas dessa maneira. A pureza das amostras e o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal ovino foram obtidas por meio de SDS-PAGE a 15% corada com nitrato de prata (LAEMMLI, 1970). As proteínas foram analisadas pelo método de Biureto por meio de kit diagnóstico da Gold Analyza®. Ao final, as proteínas de interesse foram congeladas a -80°C até o momento do uso.

2.3 Colheita de sêmen equino

Os animais selecionados pertencem a um Centro de Colheita de Sêmen da cidade de Umuarama, Paraná, Brasil e estavam em rotina de colheita de sêmen. Uma amostra de sêmen de cada equino foi colhida por meio de vagina artificial, modelo Colorado, de três cavalos da raça Quarto de Milha, de cinco anos, que atendiam às normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), com auxílio de égua em cio como manequim, devidamente contida para evitar acidentes com o garanhão e com o médico veterinário que colheu o sêmen.

2.4 Procedimento Experimental e Congelação do sêmen

O sêmen equino foi congelado no Centro de Colheita de Sêmen seguindo o método proposto por Kneissl (1993), no qual a refrigeração é realizada primeiramente, seguida da congelação em nitrogênio líquido. Para tanto, o sêmen total colhido foi avaliado quanto à motilidade e vigor, bem como uma avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Todos os parâmetros avaliados estavam de acordo com os padrões mínimos descritos pelo CBRA. Após a colheita, um diluente de transporte Botusêmen (Botupharma®) foi adicionado ao sêmen. Em seguida, foi centrifugado a 670G por 10 min para retirada do plasma seminal (sobrenadante), que foi descartado. O volume do precipitado contendo espermatozoides foi de aproximadamente 3.750 µL, e o diluente de congelação de sêmen equino comercial (Botucurio / Botupharma™) foi adicionado na proporção de 1:1, totalizando 7.500 µL.

Esta solução foi dividida em cinco microtubos contendo 1500 μL cada. A proporção de proteína adicionada ao sêmen seguiu a regra: 0 (controle), 1x e 2x, onde nenhuma proteína foi adicionada ao primeiro microtubo (controle). No segundo microtubo foram adicionados 40 μL da mistura de proteínas DorperSPP-2 (1xP2), e em outro microtubo 80 μL desta mesma fração (2xP2). No quarto microtubo, foram adicionados 70 μL da proteína isolada DorperSPP-3 (1xP3) e no último microtubo, 140 μL desta mesma fração (2xP3).

Cada uma das soluções de microtubo foi embalada em seis palhetas de 250 μL , contendo aproximadamente 20 milhões de espermatozoides viáveis em cada palheta como ilustrado na Figura 3. Após a adição de proteínas DorperSPP ao sêmen equino, o conteúdo final dessas proteínas nas amostras foi de 0,016 g/dL^{-1} (tubo 1xP2), 0,033 g/dL^{-1} (tubo 2xP2), 0,018 g/dL^{-1} (tubo 1xP3) e 0,036 g/dL^{-1} (tubo 2xP3). As palhetas foram então refrigeradas a 5 ° C por 20 min. Após o resfriamento, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido em posição horizontal a uma distância de 4 cm da superfície do líquido por 15min. Após esse procedimento, todas as palhetas foram imersas simultaneamente em nitrogênio líquido e, a seguir, armazenadas em cilindro criogênico na presença de nitrogênio líquido por 35 dias.

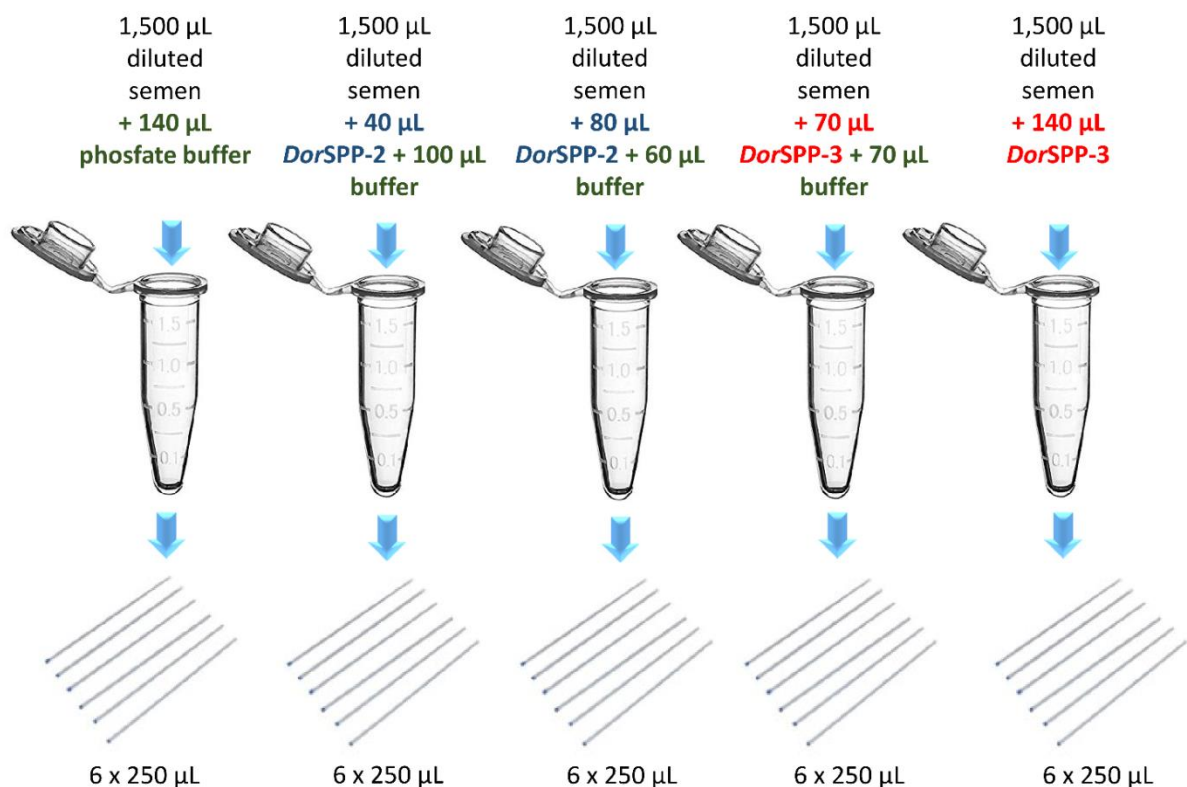


Figura 3. Projeto experimental para adição das proteínas DorperSPP-2 e DorperSPP-3 ao sêmen de cavalo e armazenamento.

2.5 Descongelamento do Sêmen

Decorridos 35 dias de estocagem em nitrogênio líquido, as palhetas de cada tratamento (6 palhetas), foram descongeladas em banho maria a 37°C/30seg e avaliadas no sistema automatizado CASA.

2.6 Análise da viabilidade espermática pós descongelamento

A análise computadorizada foi realizada no centro de pesquisa da Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM/Maringá, com a utilização do sistema automatizado Computer Assisted Semen Analysis (CASA) para avaliações seminais pós-descongelamento, usando o software AndroVision™ (Minitüb®, Tiefenbach, Alemanha), que visualiza, digitaliza e analisa imagens de espermatozoides sucessivas, fornecendo assim informações precisas e significativas sobre a cinética celular individual bem como valores estatísticos resumidos da população global.

Imediatamente após o descongelamento, uma amostra de 3 µL foi retirada de cada palheta para avaliação CASA. Uma câmara de leitura (contagem padrão Leja™, SC20.01.FA, 20 µ) foi usada, e três campos distintos de cada amostra foram automaticamente registrados e avaliados através do microscópio e sistema de computador. Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade curvilínea, (VCL; µm / s), velocidade em linha reta (VSL; µm·s⁻¹), velocidade média do caminho (VAP; µm·s⁻¹), distância curvilínea (DCL; µm), distância reta (DSL; µm), distância média percorrida (DAP; µm), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimento cruzado (BCF; Hz), oscilação (WOB; [VAP / VCL] × 100) e linearidade (LIN; [VSL / VCL] × 100). Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.4, versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC), utilizando também o teste de tukey, com significância de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Cromatografia de filtração em gel

A separação das proteínas do plasma seminal foi realizada por etapas consecutivas de cromatografia de filtração em gel. Primeiro em Sephadex G25 (Figura 4-A), em seguida, Sephacryl S200 (Figura 4-B) onde as proteínas correspondentes aos picos DorperSPP-1, DorperSPP-2 e frações DorperSPP-3 (Figura 4-B) foram colhidos separadamente.

Na figura 4-A, 200 μ L de plasma seminal de carneiros Dorper eluídos em sephadex G25 visando a identificação do pico contendo todas as frações protéicas. Este pico foi coletado separadamente, concentrado e inserido em uma coluna preenchida com Superdex S-200 (B). As frações proteicas relativas aos três picos identificados neste cromatograma foram coletadas separadamente. Em seguida, a fração DorperSPP-3 foi colhida e purificada em uma coluna Superdex S-200 10/300 (C). O gráfico em (D) mostra o conjunto de dados de calibração usado para calcular o peso molecular das proteínas DorperSPP. 500 μ L da mistura de proteínas de pesos moleculares conhecidos (pontos pretos) foram aplicados: Ferritina (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Canalbumina (75 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa) em Superdex Coluna -200 10/300. Os volumes de eluição dos pontos pretos e DorperSPP-3 (ponto azul) foram convertidos em K_{av} e representados graficamente contra seus pesos moleculares. O peso molecular de DorperSPP-3 foi calculado por ajuste linear. O fluxo de eluição foi de 0,5 mL/min⁻¹ a 23 ° C.

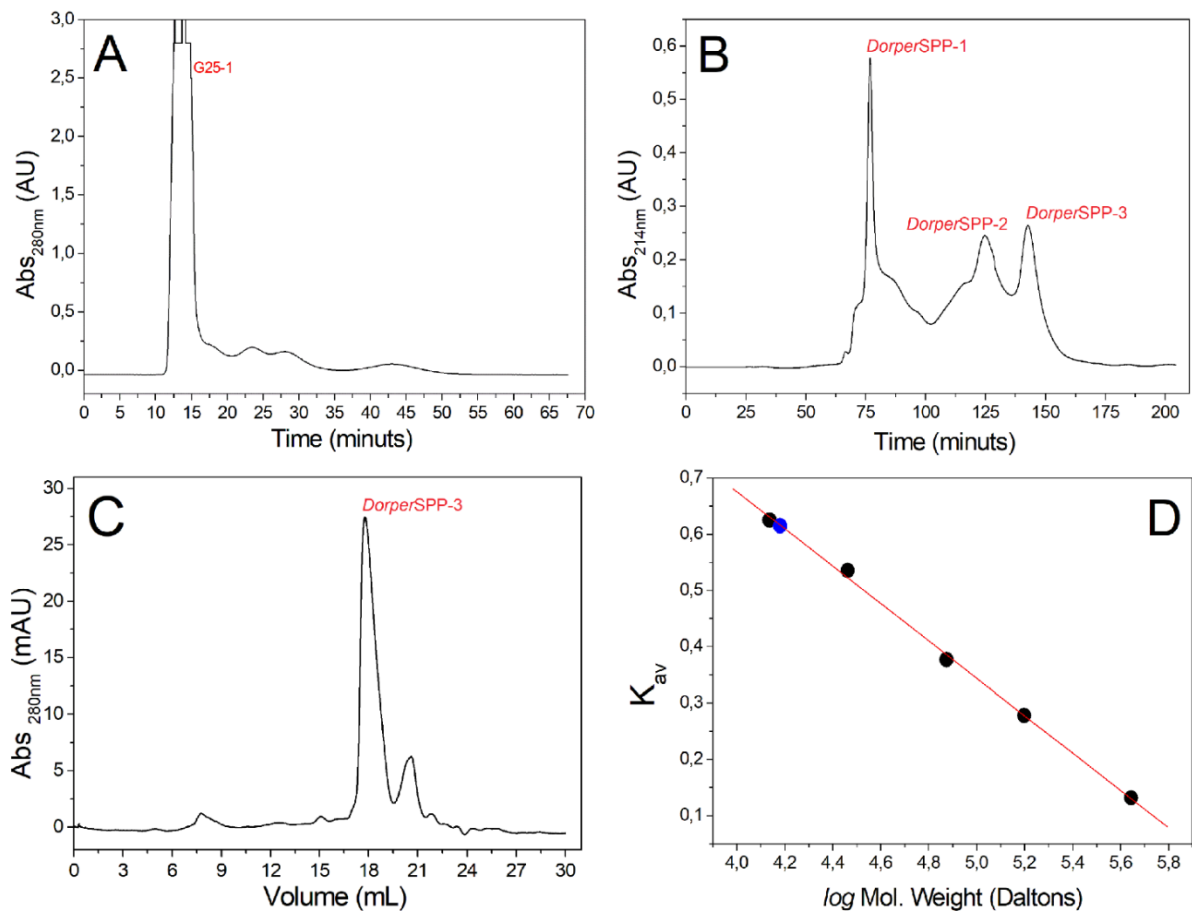


Figura 4. Cromatogramas de eluição obtidos pela passagem de amostras por diferentes colunas de filtração em gel. (A) Plasma seminal ovino passado em coluna sephadex G25; (B) Pico de eluição de coluna sephadex G-25 passado em coluna Superdex S-200; (C) Fração DorperSPP-3 coletada e purificada em uma coluna Superdex S-200 10/300; (D) Conjunto de dados de calibração usado para calcular o peso molecular das proteínas DorperSPP.

Os picos de eluição iniciais em torno da fração DorperSPP-1 continham todas as proteínas com peso molecular maior que 20 kDa, portanto essas proteínas não foram utilizadas em nossos ensaios devido as espermidinas possuírem peso menor. As frações DorperSPP-2 e DorperSPP-3 foram filtradas separadamente na coluna Superdex S200-10 / 300, onde DorperSPP-2 mostrou ser formado por várias subfrações, sendo as principais denominadas DorperSPP-2D e DorperSPP-2E (Figura 4 e Figura 5).

O resultado (Figura 5) sugere que esta fração pode ser composta por 8 proteínas de diferentes pesos moleculares, no mínimo. Os pesos moleculares estimados para os componentes principais DorperSPP-2D (ponto azul) e DorperSPP-2E (ponto verde) foram 33,0 e 18,5 kDa, respectivamente. Uma vez que a eletroforese SDS-PAGE da fração DorperSPP-2D não mostrou nenhuma banda com um peso molecular próximo a 33 kDa, a interpretação mais provável é que esta proteína seja um homodímero em sua unidade biológica que seria formada por duas subunidades de ~ 16,5 kDa.

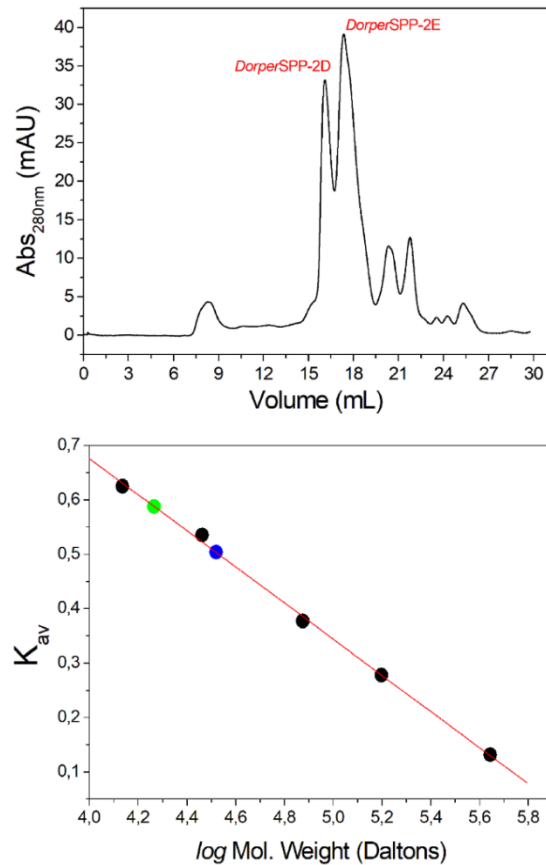


Figura 5. Cromatograma mostrando a eluição da fração DorperSPP-2 através da coluna Superdex S200-10 / 300.

Após a separação cromatográfica, as frações DorperSPP-2 (mistura de proteínas) e DorperSPP-3 foram concentradas em $\sim 0,64 \text{ g/dL}^{-1}$ ($6,4 \text{ mg/mL}^{-1}$) e $\sim 0,46 \text{ g/dL}^{-1}$ ($4,6 \text{ mg/mL}^{-1}$), respectivamente, para uso em ensaios subsequentes. Assim, DorperSPP-3 é proporcionalmente o principal componente do plasma seminal de carneiros Dorper.

3.2 Validação da purificação de proteínas do plasma seminal de carneiro

Após a separação do plasma por centrifugação, as amostras foram misturadas para se obter um *pool* de plasma. As frações de proteína presentes neste *pool* são mostradas na Figura 6.

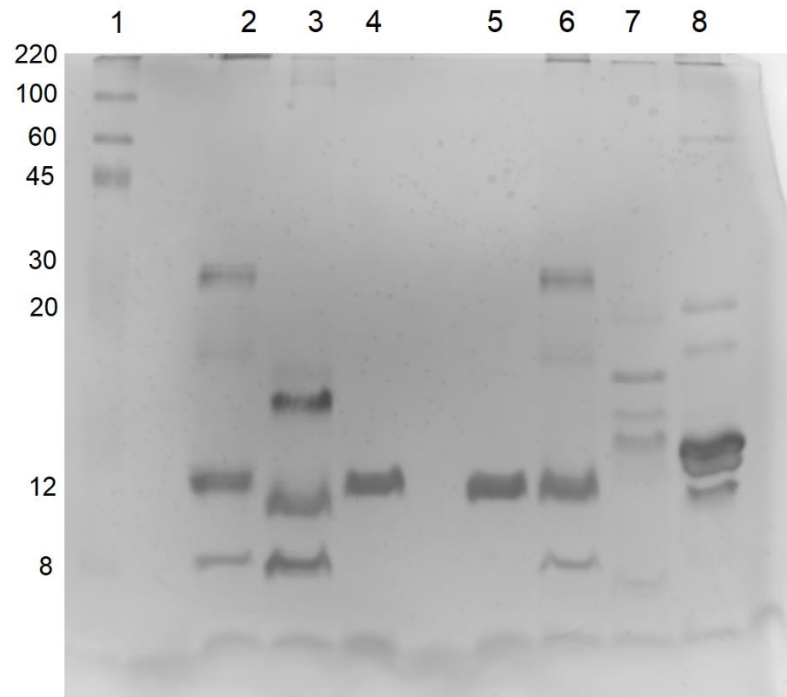


Figura 6. SDS-PAGE corado com prata 15%. A pista 1 contém o marcador ColorBurst C1992 Sigma®. *Pool* de plasma seminal Carneiro Dorper (pistas 2 e 6); DorperSPP-3 purificado em duas concentrações diferentes (pistas 4 e 5); DorperSPP-2 (pista 3); plasma seminal de cavalo (pista 7) e plasma seminal de touro (pista 8).

Os principais componentes do plasma seminal de carneiros Dorper correspondem a proteínas com peso molecular variando entre ~ 12 a ~ 30 kDa (Fig. 6), um resultado semelhante ao observado em carneiros Texel (SOUZA et al., 2012; BERGERON et al., 2005; CONDESSA et al., 2018). A literatura relata que as proteínas dentro dessa faixa de massa pertencem ao grupo das espermadesinas e proteínas que contêm os domínios da fibronectina tipo II (BERGERON et al., 2005).

O fato de o sêmen de uma determinada espécie congelar melhor do que de outra e tem a ver com a tecnologia disponível, entretanto, o papel das proteínas de baixo peso molecular no plasma seminal em uma eventual melhora da viabilidade espermática pós-descongelamento foi investigado neste trabalho. Assim, optou-se por purificar as proteínas de baixo MW (entre 12 e 18 kDa) do sêmen ovino, devido à alta expressão dessas proteínas nesta espécie.

3.3 Criopreservação de sêmen equino tratado

As análises dos parâmetros de viabilidade do sêmen descongelado que recebeu a mistura de proteínas DorperSPP-2 são mostradas na Figura 7 e Tabela 1. Considerando um erro de 5%, não foram observadas alterações significativas na maioria dos parâmetros avaliados. A Tabela

1 mostra as variações obtidas para cada parâmetro avaliado pelo CASA para as duas condições de tratamento utilizando a mistura de proteínas DorperSPP-2. Dos 12 parâmetros avaliados, apenas VCL, VSL e VAP mudam de forma significativa ($p > 0,05$).

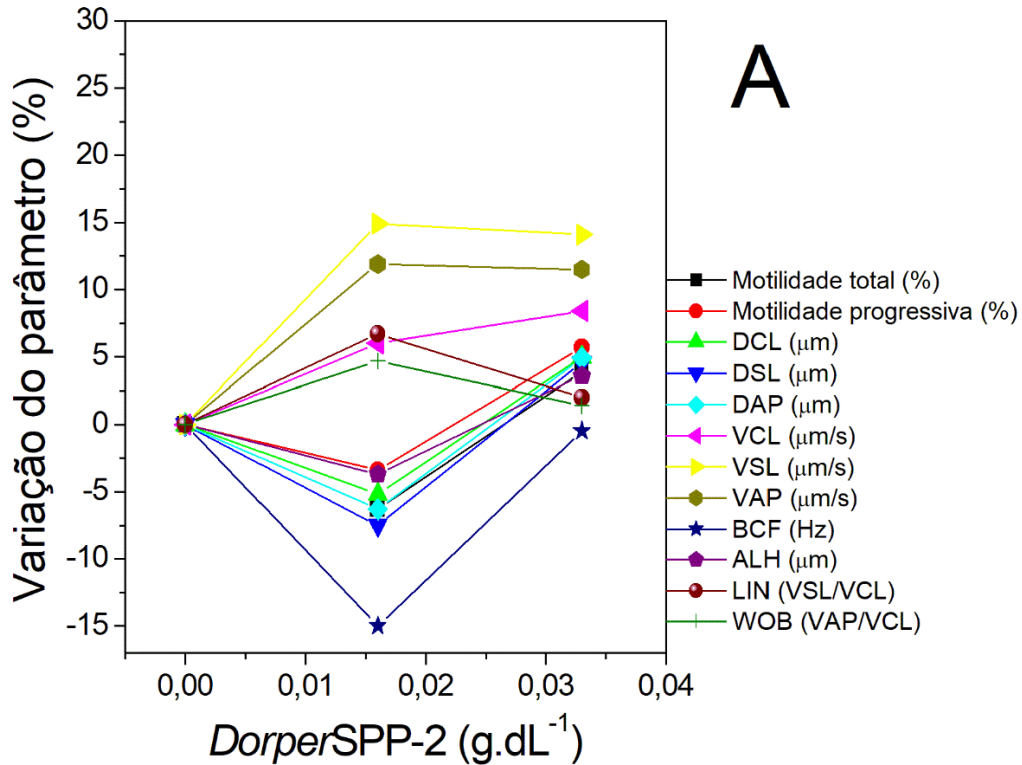


Figura 7. Parâmetros de viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas para a mistura da proteína DorperSPP-2. Cada ponto no gráfico representa a classificação média de seis palhetas descongeladas de três garanhões diferentes.

Tabela 1. Variações (médias) obtidas a partir dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das condições de ensaio (**negrito**) para sêmen tratado com a mistura de proteínas DorperSPP-2.

Parâmetros	Condição/tratamento				
	0x	1x	% relativa	2x	% relativa
Motilidade total (%)	18,7	18,3	-6,3	17,4	9,8
Motilidade progressiva (%)	13,6	13,9	-3,4	12,5	7,7
DCL (mm)	25,0	23,9	-5,2	23,9	14,2
DSL (mm)	12,7	12,4	-7,5	12,8	5,9
DAP (mm)	14,6	14,2	-6,3	14,4	7,4
VCL ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)	19,9	21,0	6,0	21,5	16,2
VSL ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)	9,6	11,1	14,9	11,0	12,3
VAP ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)	11,4	12,9	11,9	12,9	12,6
BCF (Hz)	1,4	1,1	-15,0	1,4	-4,2
ALH (mm)	2,5	2,6	-3,7	2,4	0,4

LIN (VSL/VCL)	0,5	0,6	6,7	0,6	2,6
WOB (VAP/VCL)	0,6	0,6	4,7	0,6	2,0

A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição (1x ou 2x) mudou em relação ao controle (0). Valores positivos indicam melhora, enquanto valores negativos indicam piora.

As análises dos parâmetros de viabilidade do espermatozoide para o sêmen descongelado que recebeu a mistura de proteínas DorperSPP-3 são mostradas na Figura 8 e Tabela 2. A Tabela 2 apresenta os dados de viabilidade espermática obtidos pelo CASA a partir do sêmen descongelado que foi previamente tratado com a proteína DorperSPP-3. Na concentração de 1x, verificou-se que, dos 12 parâmetros avaliados, 10 apresentaram melhora em relação ao grupo controle, enquanto na concentração 2x, 11 parâmetros apresentaram resultados melhores que o grupo controle ($p > 0,05$).

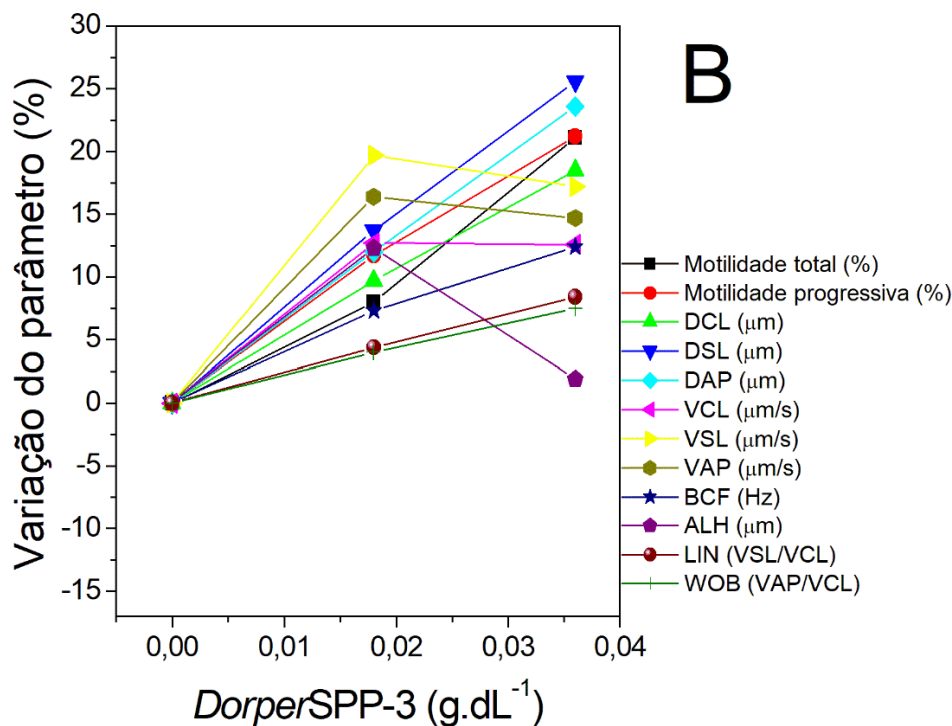


Figura 8. Parâmetros de viabilidade espermática fornecidos pelo CASA nas três concentrações avaliadas para a mistura da proteína isolada DorperSPP-3. Cada ponto no gráfico representa a classificação média de seis palhetas descongeladas de três ganhões diferentes.

Tabela 2. Variações (médias) obtidas a partir dos parâmetros avaliados pelo CASA em cada uma das condições de ensaio (negrito) para sêmen tratado com a mistura de proteínas

DorperSPP-3. A coluna "% relativa" mostra o quanto a condição (1x ou 2x) mudou em relação ao controle (0). Valores positivos indicam melhora, enquanto valores negativos indicam piora.

Parâmetros	Condição/tratamento				
	0x	1x	% relativa	2x	% relativa
Motilidade Total (%)	18,7	19,3	8,0	19,3	21,1
Motilidade Progressiva (%)	13,6	14,4	11,7	13,8	21,2
DCL (mm)	25,0	26,7	9,7	31,4	18,5
DSL (mm)	12,7	14,4	13,7	19,6	25,6
DAP (mm)	14,6	16,2	12,0	21,3	23,6
VCL ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)	19,9	22,4	12,7	22,1	12,6
VSL ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)	9,6	11,5	19,7	11,4	17,2
VAP ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)	11,4	13,4	16,4	13,3	14,7
BCF (Hz)	1,4	1,4	7,3	1,5	12,4
ALH (mm)	2,5	2,9	12,3	2,2	1,9
LIN (VSL/VCL)	0,5	0,6	4,4	0,6	8,4
WOB (VAP/VCL)	0,6	0,6	4,0	0,6	7,5

Os resultados deste tratamento indicam que onze parâmetros mostraram melhora significativa em relação ao grupo controle de uma maneira dependente da concentração (Figura 4). São eles: motilidade total, motilidade progressiva, linha curva de distância (DCL), linha reta de distância (DSL), caminho médio de distância (DAP), frequência de batimento cruzado (BCF), linearidade (LIN) e oscilação (WOB). Os parâmetros velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do caminho (VAP) também apresentaram melhora, mas não de forma dependente da concentração. O mesmo padrão de comportamento também foi observado no tratamento com a fração DorperSPP-2 (Tabela 1). Há uma relação positiva entre os valores de VAP, VSL e VCL e as taxas de fertilidade, sem alteração dos valores de ALH.

4. DISCUSSÃO

De uma forma geral, o perfil eletroforético do plasma seminal de carneiros e touros expressam maiores quantidades de proteínas de baixo peso molecular (DRUART et al., 2013) (Figura 6). No entanto, essa analogia se refere à quantidade de proteína expressa e não à natureza e diversidade dessas proteínas. Coincidentemente ou não, carneiros e touros são considerados “good coolers” e seu sêmen congelado apresenta maior viabilidade após o descongelamento em relação ao de cavalos, que apresentam menor quantidade de expressão dessas proteínas (AMANN e PICKETT, 1987; DRUART et al., 2013) (Figura 6).

É interessante notar que proteínas com peso molecular de ~ 12 a ~ 18 kDa seriam praticamente inseparáveis pelo método de filtração em gel usado porque suas massas moleculares são muito próximas. No entanto, uma vez que as condições de filtração em gel utilizadas permitem que proteínas maiores eluam primeiro, tornou-se evidente que a proteína contida na fração DorperSPP-2D (Figura 5) pode ter se reunido em unidades maiores como homodímeros, o que lhes permitiu eluir separadamente de DorperSPP-2E. Na verdade, a fração DorperSPP-2 mostrou ter várias subfrações após passar pela coluna Superdex S200-10 / 300 (Figura 5), onde alguns dos principais componentes tinham pesos moleculares acima de 18,4 kDa, um dos sendo eles compatíveis com um dímero.

Após purificação e concentração dessas frações proteicas, elas foram utilizadas em ensaios de criopreservação de sêmen. Sendo esse sêmen acrescido de um diluente de transporte para centrifugação, e além disso, o fato desse sêmen ter sido previamente centrifugado para retirada do sobrenadante ocasionou a retirada da maior parte das proteínas do plasma seminal no processo. A adição do segundo aditivo, o diluente de congelamento, diluiu ainda mais o já baixo teor de proteína que poderia ter permanecido. Portanto, o baixíssimo teor de proteínas do plasma seminal que permaneceu na amostra contribuiu para tornar mais proeminente o efeito das proteínas adicionadas.

Nos experimentos de criopreservação realizados neste presente trabalho, usou-se sêmen de três garanhões diferentes. Como o sêmen de diferentes animais pode apresentar propriedades diferentes que refletem em oscilações nos valores dos parâmetros CASA, optou-se por apresentar os dados de cada parâmetro CASA como porcentagens de mudanças, além dos valores absolutos. Essa foi a forma encontrada para normalizar os valores e permitir uma análise comparativa dos resultados.

Ao considerar a motilidade, pode ser visto a partir dos dados que a adição da mistura de proteínas DorperSPP-2 não promove melhora significativa. Apenas os parâmetros relacionados à velocidade do espermatozoide (VCL, VSL e VAP) apresentaram tendência de melhora, porém, como esse comportamento foi observado nos dois tratamentos com as frações, não atribuímos isso às proteínas adicionadas. Com base nesses resultados, a adição de proteínas contidas na fração parcialmente purificada de DorperSPP-2, cujos principais componentes proteicos possuem peso molecular de 16,5 e 18,5 kDa, não afeta a viabilidade espermática pós-descongelamento (Figura 4 e Tabela 1).

A Figura 8 representa a avaliação da viabilidade do esperma para sêmen descongelado que recebeu a proteína DorperSPP-3 purificada. Observou-se melhora em todos os parâmetros avaliados, exceto ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça), porém, este parâmetro praticamente não mudou com nenhum dos tratamentos.

A adição de uma concentração mais elevada (2x) da proteína DorperSPP-3 teve claramente um efeito de melhoria na motilidade dos espermatozoides em 21% e em 22,5% considerando a média dos parâmetros DCL, DSL e DAP. Ou seja, a presença da proteína DorperSPP-3 até o limite de concentração utilizado neste trabalho influenciou positivamente os principais parâmetros espermáticos.

Estudos de análise proteômica (BARRIOS et al., 2000) e caracterização bioquímica (BARRIOS, 2005) do plasma seminal de carneiros europeus Aragonese Rasa mostraram que a suplementação de sêmen com duas proteínas de baixo peso molecular (14 e 20 kDa) de sua própria espécie evitou danos à membrana da célula espermática causada por choque frio durante a congelação. Ele ainda reverte os danos de congelação dos espermatozoides sem tratamento prévio. Evidências desse tipo de proteção já haviam sido relatadas por nosso grupo de pesquisa por meio de simulações computacionais e estudos de desnaturação térmica de espermadesinas de carneiros de Texel (CONDESSA et al., 2018).

Um trabalho também realizado investigando potencial de dois tipos de proteínas seminais (BSPs) denominados BSP1 e BSP5 do plasma seminal de carneiro para prevenir danos associados a congelação, aos parâmetros funcionais dos espermatozoides de carneiros (PINI et al., 2018). Seus resultados sugerem que a suplementação pré-congelamento de BSPs tem potencial para efeitos positivos sobre aspectos da motilidade pós-descongelamento dos espermatozoides ovinos, embora os autores não sequenciem essas proteínas, em seus resultados.

Uma vez que o uso da proteína DorperSPP-3 sozinha forneceu viabilidade espermática pós-descongelamento melhorada em comparação com as proteínas contidas na fração DorperSPP-2, foi justificado que as análises estruturais e biofísicas subsequentes se concentraram apenas na proteína DorperSPP-3.

Estudo realizado por Vasquez et al. (2019), mostrou que o plasma seminal de ovinos pode reduzir os danos causados pela congelação e descongelação, pois compararam sêmen ovino congelado com e sem o plasma seminal, com a adição de dois meios diluentes diferentes.

Além disso, afirmaram que os danos podem ser aumentados quando na presença de extensor, principalmente a base de gema de ovo.

Trabalho recente demonstrou que uma proteína produzida pela vesícula seminal de camundongos (SPINK3), quando adicionada ao sêmen de carneiro pós descongelação melhora parâmetros seminais destes, principalmente a motilidade total e progressiva (ZALAZAR et al., 2020). Tendo efeito sobre a membrana plasmática do espermatozoide, causando a estabilização da mesma.

O plasma seminal de garanhões considerados “*good coolers*” ou “*bad coolers*”, quando adicionado ao sêmen antes da congelação não proporcionou um efeito adicional nos parâmetros espermáticos de espermatozoides de garanhões (ESSAWE, 2019), mas espermatozoides de epidídimo quando encubados antes da congelação em plasma seminal (VIEIRA et al., 2020) ou a utilização de proteínas com ligação ou não a heparina (BUBENICOKVA et al., 2020), tiveram resultados melhores quando comparados ao grupo controle, confirmando assim que existe muita variação dentro da espécie, e assim a adição de proteínas seminais de outras espécies pode ser benéfico.

A motilidade espermática ainda é um parâmetro importante para avaliar a qualidade do sêmen em garanhões (VARNER, 2008; LOVE et al., 2015). Quando se avalia em neste presente experimento a adição da proteína DorperSPP-3, melhorou a motilidade total e progressiva em mais de 20%, quando compara-se ao grupo controle, pois o papel da espermadesina é se ligar a superfície espermática (CABALLERO et al., 2009).

5. CONCLUSÕES

Os principais componentes do plasma seminal dos carneiros Dorper na faixa de 10 a 20 kDa correspondem a três proteínas. Seus pesos moleculares estão entre 15,1 e 18,5 kDa, e foram separados com sucesso por cromatografia de filtração em gel.

A adição da proteína DorperSPP-3 purificada ao sêmen de garanhão antes da congelação até a concentração de 0,036 g/dL⁻¹ promoveu um efeito estimulante sobre os principais parâmetros avaliados pelo CASA, linearmente de forma dependente da concentração até o limite das concentrações utilizadas nestes ensaios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- BARBACINI, S.; LOOMIS, P.; SQUIRES, E.L. 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.203–5, 2005.
- BARRIOS, B.; PÉ R.P.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; BLANCO, T.M. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane1. **Biology of Reproduction**, p.63, p.1531–7, 2000.
- BARRIOS, B. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, v.26, p.539–49, 20005.
- 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.
- BUBENICKOVA, F.; POSTLEROVA, P.; SIMONIK, O.; SIROHI, J.; SICHTAR, J. Effect of Seminal Plasma Protein Fractions on Stallion Sperm Cryopreservation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.17, p.6415, 2020.
- CABALLERO, I.; VÁSQUEZ, J.M.; MAYOR, G.M.; ALMIÑANA, C.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. PSP-I/PSPII spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.32, p.505-513, 2009.
- 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 2018.
- DRUART, X; RICKARD, J.P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P.L.; YOUNG, C.M.K.; BATHGATE, R. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**, v.91, p.13–22, 2013.
- ESSAWE, E.A. Equine seminal plasma: its role in protecting stallion spermatozoa during cryopreservation. 2019. 90 f. Tese (Department of Clinical Sciences) Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Uppsala, 2019.
- 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, p286–289, 2008.
- GIL J. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157–70, 2003.
- 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.50–4, 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.112–8, 2011.
- KNEIBL S. Cryopreservation of stallion semen: the influence of semen collection techniques, centrifugation, packing forms and methods of freezing on the motility and plasma membrane integrity of spermatozoa. **Hannover**, 1993.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LOOMIS P. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.191–200, 2001.
- LOVE, C.C.; NOBLE, J.K.; STANDRIDGE, S.A.; BEARDEN, C.T.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; CAVINDER, C.A. The relationship between sperm quality in cool-shipped semen and embryo recovery rates in horses. **Theriogenology**, v.84,p. 1587-1593, 2015.
- PETERSEN, E.T. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.159-170, 2004.
- PETERSEN, E.T.; 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.
- PINI, T.; FARMER, K.; DRUART, X.; GOMES, A.P.T.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; LEAHY, T.; GRAAF, S.P. Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Cryobiology**, v. 82, p.78–87, 2018.
- REINERT, M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MANN, K; TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **European Journal of Biochemistry**, v.242, p.636-640, 1996.
- RHODES, M.A.C.; MENENDEZ, M.; SAIZ, J.L.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; SOLIS, D. Analysis of the stability of the spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer. Effects of Zn²⁺ and acidic pH. **FEBS Journal**, p.272, p.5663–70, 2005.
- ROMERO, A.; ROMAO, M.J.; VARELA, P.F.; KOLLN, I.; DIAS, J.M.; CARVALHO, A.L.; SAHA R.; ASHRAF, A.; RAHMAN, Z. Comparative Study on Conception Rate of Cow in Using Frozen and Liquid Semen. **Journal of Animal Science Advances**, v.4, p.749–72, 2014.
- SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; 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. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, v.75, p.4436-4456, 2012.
- VASQUEZ, R.R.; CESARI, A.; GRECO, M.B.; CANO, A.; HOZBOR, F. Extenders modify the seminal plasma ability to minimize freeze-thaw damage on ram sperm. **Reproduction in domestic animals**, v.00, p.1–9, 2019.
- VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.
- VIEIRA, L.A.; MATÁS, C.; TORRECILLAS, A.; SAEZ, F.; GADEA, J.; Seminal plasma components from fertile stallions involved in the epididymal sperm freezability. **Andrology**, 2020.
- ZALAZAR, L.; CUERDA, M.I.; AJOFRÍN, I.S.; GARDE, J.J.; VALLS, A.J.S.; CESARI, A. Recombinant SPINK3 improves ram sperm quality and in vitro fertility after cryopreservation. **Theriogenology**, v.144, p.45-55, 2020.

PARTE III – ELEMENTOS PÓS TEXTUAIS

ANEXO 1. Normas para submissão de artigo para a revista *Theriogenology*

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

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 lowercase 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.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights. Highlights 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).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

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; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

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.

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*Image manipulation*

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

*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.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

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. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

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.

References*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

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.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

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. Using citation 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. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

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/theriogenology> 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: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication: [1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number: [2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book: [3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book: [4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website: [5] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003]. Reference to a dataset: [dataset]

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

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also Samples of Formatted References).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are

sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in Data in Brief. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this video describing the benefits of publishing your data in Data in Brief). You are encouraged to submit your data article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an open access fee is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min.

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion).

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid

using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy." The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μL - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

s - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

y - year Routes of treatment

id - intradermal

im - intramuscular

iu - intrauterine

iv - intravenous

sc - subcutaneous

po - oral Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P - probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the *CBE Manual* or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.