

CAMILA OLIVEIRA SILVEIRA

**FORMAS DE CRISP-3, HSP-1 E HSP-2 COMO CANDIDATAS A
MARCADORES DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES DA
RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S48f
2017
Silveira, Camila Oliveira, 1984-
Formas de crisp-3, hsp-1 e hsp-2 como candidatas a
marcadores de congelabilidade do sêmen de garanhões da raça
Mangalarga Marchador / Camila Oliveira Silveira. – Viçosa,
MG, 2017.
50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cavalos. 2. Reprodução. 3. Sêmen. 4. Criopreservação.
5. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.1

CAMILA OLIVEIRA SILVEIRA

**FORMAS DE CRISP-3, HSP-1 E HSP-2 COMO CANDIDATAS A
MARCADORES DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES
DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2017.



Ciro Alexandre Alves Torres



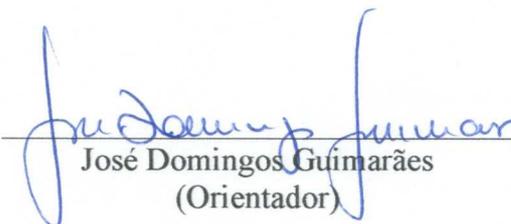
Hellen Emília Menezes de Souza



Maria Cristina Baracat Pereira
(Coorientadora)



Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)



José Domingos Guimarães
(Orientador)

“Fé de Abraão, paciência de Jó e humildade de Jesus..”

“Conserve os olhos fixos num ideal sublime, e lute sempre pelo que deseja, pois só os fracos desistem e só quem luta é digno de vida.” (Autor Desconhecido)

Dedico esta obra a Deus,
minha família, em especial a minha mãe **Ercy
Silveira**, ao meu pai **José Eustáquio de
Oliveira**, ao meu avô **Oladir José da Silveira** (*in
memorian*) e meu cachorro **Ted**.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil protéico bidimensional do plasma seminal de dois garanhões da raça Mangalarga Marchador de alta congelabilidade (A) e de baixa congelabilidade (B). As proteínas circuladas em azul representam a família HSP-1; em vermelho, HSP-2; em amarelo, CRISP-3; em roxo KLK1E2, e em preto, Albumina Sérica 43

Figura 2: Abundância entre os animais e os spots, obtidos por eletroforese bidimensional do plasma seminal de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador pós-descongelamento (T1= alto congelamento; T2= baixo congelamento). No heatmap, cores escuras representam baixa abundância de proteína e cores claras alta abundância de proteínas..... 44

Figura 3: Boxplot da mediana da massa molecular e ponto isoeletrico das famílias de proteínas identificadas, sendo A: valores de mediana referente a massa molecular e ponto isoeletrico das proteínas do tratamento de alta congelabilidade; B: valores de mediana referente a massa molecular e ponto isoeletrico das proteínas do tratamento de baixa congelabilidade..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios e erros padrão dos parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador pré-congelamento e pós-descongelamento em diferentes tempos de incubação no teste de termorressistência (37 °C) 39

Tabela 2: Identificação de proteínas* extraídas do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador, com sêmen de alta e baixa congelabilidade 40

Tabela 3: Correlação simples de Pearson entre motilidade pós-descongelamento (Motd) e os spots de proteína: S38, S39, S53, S66, S166 e S 175 do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador..... 42

RESUMO

SILVEIRA, Camila Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Formas de CRISP-3, HSP-1 e HSP-2 como candidatas a marcadores de congelabilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa, Leandro Licursi de Oliveira e Maria Cristina Baracat Pereira.

Com este estudo objetivou-se avaliar o perfil proteômico total e diferencial do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador, que apresentam variações na motilidade espermática do sêmen após descongelamento, visando identificar proteínas candidatas a marcadores de congelabilidade. Foram utilizados quatro garanhões de fertilidade comprovada, divididos em dois grupos, com dois animais em cada grupo: T1: alta congelabilidade (n= 4 ejaculados) e T2: baixa congelabilidade (n= 4 ejaculados), sendo cada tratamento composto por dois ejaculados de cada garanhão. As análises físicas do sêmen foram realizadas antes e após a criopreservação espermática. Os grupos estudados foram divididos pós-descongelamento pela avaliação da motilidade espermática total. O perfil protéico do plasma seminal foi obtido por eletroforese bidimensional, as análises de imagem dos géis foram realizadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare[®]) e a identificação das proteínas foi por espectrometria de massas usando MALDI-TOF/TOF, com o software Mascot Daemon para a busca em banco de dados. A validação das proteínas identificadas entre os tratamentos foi realizada pelo programa SCAFFOLD (95%). Os dados foram analisados pela ANOVA com 5 % de probabilidade de erro, correlações simples de Pearson e análise de regressão linear. Observou-se diferença ($p < 0,05$) em relação à motilidade espermática total do sêmen fresco e pós-descongelamento. No perfil protéico identificou-se 5 famílias de proteínas (HSP-1, HSP-2, CRISP-3, Calcreína e Albumina sérica). Destas famílias, algumas proteínas se apresentaram com diferenças em

abundância ($p < 0,05$) entre os grupos estudados, em que quatro destas podem ser consideradas possíveis candidatas a marcadores de congelabilidade (HSP-1: spot 175; HSP-2: spot 39; CRISP-3: spot 66 e 166). Conclui-se então que os ganhos da raça Mangalarga Marchador apresentam variação individual ao processo de criopreservação do sêmen e possuem possíveis proteínas candidatas a marcador de congelabilidade para raça.

ABSTRACT

SILVEIRA, Camila Oliveira, D.Sc., Federal University of Viçosa, February, 2017. **Types of CRISP-3, HSP-1 e HSP-2 as markers candidates of semen freezability of stallions of Mangalarga Marchador breed.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Eduardo Paulino da Costa, Leandro Licursi de Oliveira and Maria Cristina Baracat Pereira.

This study aimed to evaluate the total and differential proteomic profile of the seminal plasma of stallions of Mangalarga Marchador breed that presented variations in sperm motility after thawing, intending to identify candidate proteins as freezability markers. Four proven fertility stallions were used and split in two groups with two animals in each group: T1: high freezability (n= 4 ejaculates) and T2: low freezability (n= 4 ejaculates) with two ejaculates of each stallion in each treatment. Semen analysis were made before and after criopreservation. The studied groups were divided after thawing by the evaluation of total sperm motility. The protein profile of the seminal plasma was obtained by bidimensional electrophoresis. The analyses of the images of the gels were performed by the ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare[®]) program and the proteins identification were made by the mass spectrometry using MALDI-TOF/TOF with the software Mascot Daemon for database search. The validation of identified proteins between treatments was performed by SCAFFOLD (95%) program. The data were analyzed by ANOVA, Pearson's simple correlations and linear regression analysis with 5 % of error probability. Differences were observed ($p < 0.05$) in relation to total sperm motility of fresh and after thawing semen. At protein profile, 5 protein families (HSP-1, HSP-2, CRISP-3, Kallikrein and Serum albumin) were identified. Of these families some proteins presented differences in abundance ($p < 0.05$) between studied groups in which four of them can be considered as possible markers candidates of semen freezability (HSP-1: spot 175; HSP-2: spot 39; CRISP-3: spot 66 and 166). It can

be concluded that stallions of Mangalarga Marchador breed present individual variation to semen cryopreservation process and have possible proteins as markers candidates of semen freezability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Plasma Seminal.....	3
2.1.2 Proteínas do Plasma Seminal	4
2.1.2.1 Proteínas que Contêm o Domínio Fibronectina Tipo II (Fn-II)	5
2.1.2.2 Proteínas Secretórias Ricas em Cisteína (CRISPs):	6
2.1.2.3 Espermadesinas:	8
2.1.2.4 Calcreínas:	8
2.2 Criopreservação do Sêmen	10
3. Referências Bibliográficas.....	12
FORMAS DE CRISP-3, HSP-1 E HSP-2 COMO CANDIDATAS A MARCADORES DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR.....	15
Resumo.....	15
1. Introdução	16
2. Material e Métodos	18
2.1 Materiais	18
2.2 Animais e Coleta de Sêmen	18
2.3 Avaliação Espermática	19
2.4 Desenho Experimental	19
2.5 Criopreservação Espermática	20
2.6 Teste de Termorresistência	21
2.7 Análise Proteômica	21
2.7.1 Determinação da Concentração de Proteína:	21
2.7.2 Eletroforese Bidimensional:	21
2.7.3 Aquisição e Análise das Imagens.....	22
2.7.4 Identificação das Proteínas:	22
2.8 Análise Estatística	23
3. Resultados	24
3.1 Motilidade espermática total.....	24
3.2 Análise Proteômica	24
4. Discussão	28
5. Conclusões.....	34
6. Referências Bibliográficas	35
Material Suplementar	46

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen em equinos é uma biotecnologia de grande interesse no agronegócio do cavalo, pois maximiza a utilização de reprodutores por possibilitar a sua utilização em haras distantes e por manter o material genético estocado por tempo indeterminado (Loomis, 2001).

Alguns autores, como Samper e Morris (1998) e Loomis e Graham (2008) relatam que esta biotecnologia ainda é subutilizada devido à variabilidade individual dos animais. Cada garanhão responde de maneira diferente ao processo de criopreservação do sêmen. Dessa forma, os ejaculados dos equinos podem ser classificados como sendo de alta ou baixa congelabilidade, esta classificação é feita baseado na capacidade dos espermatozoides em resistirem aos processos de congelamento (Aurich, 2008).

Um fato que dificulta a seleção de garanhões doadores de sêmen com alta aptidão para criopreservação do sêmen ocorre devido à seleção dos animais ser realizada pelo seu desempenho atlético, seu pedigree, sua conformação, seu andamento, principalmente quando se diz respeito a cavalos de marcha, ao invés de selecionar pelo potencial reprodutivo do mesmo (Varner et al., 2008). Resultado disto seria a falta de padronização nos protocolos de congelamento e descongelamento (Vidament, 2005).

Segundo Aurich (2008), outro fator que determina esse atraso no avanço da utilização de sêmen criopreservado em equinos é a composição do plasma seminal e da membrana plasmática. Segundo Mann e Lutwak-Mann (1981), o plasma seminal é constituído de água, íons inorgânicos, sais orgânicos, ácido cítrico, açúcares, prostaglandinas e um variado número de proteínas, possuindo a função tampão visando estabilizar o pH e a osmolaridade. Este fato proporciona também, fontes de energia para o metabolismo espermático de forma aeróbica e anaeróbica. De acordo com Garcia (2014), as proteínas secretadas no plasma seminal contribuem de forma marcante na regulação da maior parte das funções espermáticas.

Estudos demonstram que a adição do plasma seminal de sêmen de alta congelabilidade ao sêmen com baixa motilidade espermática após o congelamento-descongelamento aumentou significativamente a motilidade progressiva (Aurich et al., 1996). Este fato pode ser atribuído aos componentes do plasma seminal que possuem funções diversas e importantes de estabilização da célula espermática e interação espermatozoide-ovócito (Gwathmey et al., 2003; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005).

Objetivou-se com este estudo identificar e descrever proteínas do plasma seminal presentes em animais doadores de sêmen de alta e baixa congelabilidade, correlacionando-as com os parâmetros espermáticos de motilidade, sendo estes dados expostos em forma de artigo científico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plasma Seminal

Mann e Lutwak-Mann (1981) classificaram o plasma seminal como o fluido no qual os espermatozoides se encontram suspensos no ejaculado, atuando como meio de sobrevivência e transporte espermático. Os mesmos autores destacam ainda que esse fluido é complexo, sendo constituído por: alta porcentagem de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas, grande variedade de proteínas que atuarão como tampão, mantendo a osmolaridade e pH adequados, como também, proporcionar fontes de energia para os espermatozoides, tanto sob condições aeróbicas quanto anaeróbicas.

Li (1975) acrescenta ainda que o plasma seminal é composto por antioxidantes importantes para preservação espermática durante a criopreservação, tais como: ascorbato, urato, grupos tióis, glutathione, α -tocoferol, além de enzimas como catalases, superóxido dismutase e glutathione redutase.

As secreções do plasma seminal são produzidas pelos epidídimos, ampolas dos ductos deferentes, próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbo-uretrais (Varner et al., 1987). É comprovada sua função no transporte dos espermatozoides pelos órgãos genitais masculino e feminino, além da influência do plasma seminal na fisiologia espermática. As proteínas, por exemplo, demonstram ter influência na maturação espermática, estabilização da membrana, capacitação dos espermatozoides e há interação das mesmas com as secreções da tuba uterina (Topfer-Petersen et al., 1998; Manjunath e Therien, 2002; Gwathmey et al., 2003; Gwathmey et al., 2006).

Porém, há controvérsias quanto ao efeito do plasma na função espermática, sendo reportados alguns estudos mostram ação positiva nos espermatozoides, enquanto outros trabalhos demonstram o inverso, dependendo da espécie em questão. Entre os animais, também ocorre variações desses efeitos, sendo que estas podem ser explicadas, de forma hipotética, pela variação na composição de proteínas do plasma seminal nas espécies (Maxwell et al., 1999; Maxwell et al., 2007; O'Meara et al., 2007; Leahy et al., 2010).

Vários estudos destacam o efeito deletério do plasma seminal no resfriamento e congelamento de sêmen equino. No resfriamento e congelamento utilizando uma proporção em torno de 5 % do plasma seminal, a motilidade espermática total apresenta-se melhor quando comparada ao sêmen resfriado ou criopreservado com altas taxas de plasma seminal (10 – 30 % - Jasko et al., 1991; Braun et al., 1994; Alghamdi et

al., 2002). É preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), a retirada do plasma seminal para o congelamento de sêmen equino. Entretanto, Brinsko et al. (2000) descrevem que a presença de pequenas porcentagens de plasma seminal são necessárias aos espermatozoides, estando relacionado com o armazenamento do sêmen e a fertilidade.

2.1.2 Proteínas do Plasma Seminal

Grande parte das proteínas encontradas no plasma seminal do garanhão é proveniente dos epidídimos. Essas proteínas se encontram relacionadas com a remodelação da membrana espermática que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação (Dacheux et al., 2003). Essas proteínas estão em concentrações relativamente pequenas (10 mg/mL) quando comparadas aos demais mamíferos que apresentam 20-60 mg/mL (Topfer-Petersen et al., 2005).

Nos epidídimos, a secreção de proteínas ocorre de forma regionalizada, sendo a cabeça e o corpo as regiões mais ativas. Cerca de 73 % dos compostos protéicos na espécie equina são secretado na cabeça do epidídimo (Dacheux et al., 2003; Gatti et al., 2004). As proteínas epididimárias adquiridas pela membrana espermática durante o trânsito nos epidídimos são classificadas conforme sua interação com a membrana espermática (Guasti et al., 2012).

Topfer-Petersen et al. (2005) descreveram que estas proteínas estão envolvidas em vários processos visando a preservação da viabilidade espermática, interação dos espermatozoides com os órgãos reprodutivos feminino e com o processo de fertilização. As proteínas atuam, também, como bons marcadores de fertilidade, na adesão dos espermatozoides no reservatório espermático da fêmea e com a fusão aos óvulos (Martinez-Heredia et al., 2008).

Em 2003, Jonakova e Ticha, relataram que a maioria das proteínas identificadas no plasma seminal se ligam à membrana plasmática dos espermatozoides, recobrando sua superfície. Dessa forma, evita-se a aglutinação espermática, reação acrossômica prematura e fagocitose quando os espermatozoides se encontram nos órgãos genitais femininos.

Estas proteínas apresentam alta especificidade, ocorrendo sua interação tanto com polissacarídeos, fosfolipídios, lipoproteínas, íons bivalentes, como também com os receptores de membrana plasmática e da zona pelúcida (Manaskova et al., 2000). Os

fosfolipídios da membrana plasmática contém grande quantidade de fosforilcolina, constituindo o principal componente fosfolipídico da membrana. As proteínas do plasma seminal equino possuem capacidade de se ligar com essa fosforilcolina tanto quanto à heparina, sendo esta ligação necessária para o início do processo de capacitação espermática (Parks et al., 1987; Gasset et al., 1997).

Para que ocorra a fertilização, é necessário que algumas reações ocorram de forma coordenada. Portanto, as proteínas são incorporadas à superfície do espermatozoide no processo de ejaculação, interagindo com as substâncias presentes nas células epiteliais da tuba uterina, onde se iniciará o processo de capacitação até a fusão dos espermatozoides a zona pelúcida. Todos esses mecanismos são realizados pela interação das proteínas (Manaskova et al., 2003).

Em equinos, Brandon et al. (1999) correlacionaram uma proteína do plasma seminal com a fertilidade, esta possui 72 kDa, ponto isoelétrico (pI) de 5,6 e é denominada de osteopontina. Em 2002, Macpherson e colaboradores, relacionaram as concentrações de IGF1 do plasma seminal com a fertilidade e, em 2005, Gamboa e Ramalho-Santos identificaram mais três proteínas da membrana espermática que possuem implicação com a fertilidade: SNARE, caveolina-1 e NSF.

Novak et al. (2010) correlacionaram de forma negativa à fertilidade as proteínas do plasma seminal: HSP-1 (14 kDa), HSP-2 (19,2 kDa), Calcreína e clusterina, e encontraram como marcador para o mesmo parâmetro, a proteína secretória rica em cisteína (CRISP3).

As proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (FN-2), as proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) e as espermadesinas são as famílias mais encontradas no plasma seminal equino (Kareskoski e Katila, 2008).

2.1.2.1 Proteínas que Contêm o Domínio Fibronectina Tipo II (Fn-II)

Em 1996, Frazer e Bucci, estudando as proteínas do plasma seminal equino, identificaram por meio de gel SDS-PAGE, um perfil contendo 14 bandas de proteína. Mais tarde, Brandon et al. (1999) utilizando a eletroforese bidimensional obtiveram resultados similares, ou seja, 14 bandas de proteínas que foram comuns a todos os garanhões. Observou-se, também, que quatro destas, denominadas SP-1, SP-2, SP-3 e SP-4, possuíam correlação com as demais raças equinas. Outras três proteínas (SP-2, 72 kDa, pI 6,0; SP-3, 18 kDa, pI 4,3; SP-4, 16 kDa, pI 6,5) foram encontradas em altas

concentrações nos garanhões com baixa fertilidade. Enquanto a SP-1 (72 kDa, pI 5,6) apresentou correlação positiva com a fertilidade, sugerindo que esta seria homóloga a proteína associada à fertilidade em bovinos que foi descrita por Killian et al. (1993).

Calvete et al. (1994) estudaram o plasma seminal de 6 garanhões e verificaram proteínas de baixa massa molecular (14-30 kDa), sendo as HSP-1 a HSP-8. Segundo esses autores, todas essas proteínas, com exceção da HSP-4, estão ligadas na superfície espermática no momento da ejaculação. As HSP-1 e HSP-2 compreendem o grupo de proteínas mais abundantes no plasma seminal equino, representando cerca de 70 a 80 % do total das proteínas, podendo ser reconhecidas também, como SP-1 e SP-2 (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005).

Os autores acima descrevem que se pode encontrar este tipo de proteína ao longo de todos os órgãos genitais masculinos dos garanhões. Apresentam dois domínios de fibronectina em sua estrutura, em que a HSP-1 possui o tipo AABB, enquanto a HSP-2 apresenta somente um domínio ABB. A secreção dessas proteínas ocorre principalmente nas ampolas dos ductos deferentes (Saalmann et al., 2001; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005). Pertencem à mesma família das proteínas do plasma seminal de bovinos (BSP A1/A2) estando relacionadas à capacitação espermática devido sua habilidade de ligação à heparina (Topfer-Petersen et al., 2005).

Recentemente um grupo de proteínas fibronectina Fn-II foi identificado, sendo formado por quatro módulos, de origem epididimária e parecem estar relacionados com a maturação espermática. Esta proteína no equino foi denominada EQ-12 (Saalman et al., 2001).

As proteínas que possuem o domínio fibronectina ligam-se aos fosfolipídios de membrana pelo grupo fosfatidilcolina ou esfingomiélinea localizado na cabeça do espermatozoide, resultando em mudanças na estrutura da membrana (Greube et al., 2004; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005), permitindo o efluxo de colesterol (Thérien et al., 1999). Nos órgãos genitais femininos, as HSPs são capazes de interagir com os glicosaminoglicanos (Manjunath et al., 1994).

2.1.2.2 Proteínas Secretórias Ricas em Cisteína (CRISPs):

As proteínas do grupo CRISP são adicionadas aos espermatozoides durante o trânsito dos mesmos pelos epidídimos, havendo interação dessas proteínas com a bicamada lipídica da membrana espermática. As CRISPs encontram-se relacionadas

com a fusão espermatozoide - zona pelúcida, sendo proteínas andrógeno dependentes, com 227 resíduos, secretadas pelos segmentos proximais dos epidídimos e presentes na região proximal da cabeça espermática (Brooks et al., 1986, Kirchhoff, 1999). Segundo Rochberger e Cuaniscuè (1992), durante a reação acrossomal, as CRISPs migram da cabeça dos espermatozoides para região equatorial.

Ellermann et al. (1998) demonstraram que machos imunizados com a proteína CRISP tornam-se inférteis, devido ao bloqueio na fusão do espermatozoide com o oolema.

Os membros dessa família já foram isolados em humanos, ratos, suínos, equinos e cobaias, em que 40 a 80 % de seus aminoácidos já foram identificados (Morrissette et al.,1995; Kraetzschmar et al.,1996; Foster et al.,1996).

Em mamíferos, Magdaleno et al. (1997) e Schambony et al. (1998), descreveram que as proteínas da família CRISPs conservam 16 resíduos de cisteína, formando 8 pontes dissulfeto que auxiliam na estabilização de sua estrutura tridimensional.

Kraetzschmar et al. (1996) expõem os locais de secreção das proteínas CRISPs, sendo a CRISP-1 secretada especificamente nos epidídimos, a CRISP-2 principalmente nos testículos e nos epidídimos, enquanto a CRISP-3 se encontra distribuída de forma abundante, mas seu principal local de secreção seria as glândulas salivares, o pâncreas e a próstata. Schambony et al. (1998) descrevem que a CRISP-3 é encontrada em grande quantidade no plasma seminal e que estudos de qRT-PCR demonstraram que esta proteína é expressa de forma mais abundante nas ampolas dos ductos deferentes, resultando em grande quantidade de CRISP-3 no plasma seminal equino. Novak et al. (2010) correlacionaram de forma positiva a CRISP-3 com a taxa de concepção no primeiro ciclo e consideraram a mesma proteína como excelente marcador de fertilidade no equino.

Schambony et al. (1998) identificaram todos os três membros da família CRISP nos órgãos genitais masculinos de equinos, caracterizando a estrutura dessa proteína por sequenciamento de DNA.

A CRISP-1 e CRISP-2 podem influenciar de forma direta os eventos de fertilização (fusão espermatozoides-ovócitos), enquanto a CRISP-3 pode contribuir na função do plasma seminal nos órgãos genitais da fêmea. No entanto, Topfer-Petersen et al. (2005) indicavam ainda que o papel das proteínas CRISP no plasma seminal equino necessitam de maiores investigações.

Calvete et al. (1994) verificaram no plasma seminal equino, uma proteína de 27 kDa, denominada de proteína do plasma seminal equino (HSP-3), que apresenta uma sequência ampla de aminoácidos similar as CRISPs. Magdaleno et al. (1997) estudaram a HSP-3 no plasma seminal equino pelo método de ELISA, e observaram que há grande variedade na concentração dessa proteína (0,3 a 1,3 mg/mL) em garanhões. Essa é uma proteína não glicosilada e apresenta um pI de 8-9 na eletroforese bidimensional.

2.1.2.3 Espermadesinas:

São glicoproteínas de baixo peso molecular (12-16 kDa), compostas por 109 a 113 aminoácidos e constituídas estruturalmente por um único domínio CUB (domínio protéico) estabilizado por pontes dissulfídicas, atuando como suporte estrutural e ao qual pode se atribuir diferentes funcionalidade (Romero et al., 1997). Estas proteínas exibem habilidade de ligação à heparina, aos inibidores de proteinase, fosfolipídios e carboidratos (Topfer-Petersen et al., 2005).

Nos equinos, a HSP-7 é a maior representante desta classe protéica, sendo secretada no trajeto dos espermatozoides pelos ductos epididimários, sendo capaz de se ligar à zona pelúcida intacta, demonstrando seu papel na interação espermatozoides-zona pelúcida (Reinert et al., 1996).

Sua sequência só difere em três aminoácidos da proteína AWN-1 de suínos (Sanz et al., 1992). E essa proteína encontra-se apenas em suínos, bovinos e equinos, havendo tanto semelhanças quanto diferenças em relação à estrutura, atividade de interação com a zona pelúcida e relação com os espermatozoides (Reinert et al., 1996).

2.1.2.4 Calecreínas:

Na primeira porção do ejaculado dos garanhões é possível encontrar outra família de proteínas, denominadas de calecreínas. Estas são pertencentes à família das serinas proteases, apresentando tripsina como atividade proteolítica e não possuem atividade de quinogenase. Possuem capacidade de liberação de quinina via proteólise de quininogênio (Lilja et al., 1989; Carvalho et. al., 2002).

Os mamíferos possuem dois tipos de calecreína, uma do plasma sanguíneo e outra tissular, esta última presente em vários órgãos e fluidos corporais (Isackson et al. 1984). Os estudos feitos com equinos demonstraram que estes animais possuem genes

comuns com a calcreína tissular (KLK1). Nesses animais são identificadas como as HSP-6 e HSP-8 (Kareskoski et al., 2011).

A única calcreína glandular foi isolada em cães e equinos, porém, relata-se também nas espécies primatas, cão, porco, cobaia e vaca. Nos caninos a enzima esterase, chamada de arginina prostática é regulada por andrógenos e está presente em 90 % das proteínas presentes no plasma seminal dos cães. No garanhão, a secreção de calcreína possui especificidade semelhante à quimotripsina, entretanto, há também, um substrato único que permanece bloqueado (Olsson et al., 2000; Olsson et al., 2004).

Inúmeras são as funções dessas proteínas, atuando nos processos fisiológicos, como a coagulação sanguínea, fibrinólise, fertilização e produção hormonal (Isackson et al., 1984; Olsson et al., 2004). Em ratos, a calcreína é necessária ao processamento dos precursores de citocinas, atuando também, como proteínas de ligação ao fator de crescimento epidérmico e as subunidades A e G do fator de crescimento do nervo 7S no rato (Olsson et al., 2004).

A calcreína glandular é um antígeno específico da próstata, conhecido como PSA, sua secreção é dependente de andrógenos e é liberada pelo epitélio prostático. Em humanos, tanto o PSA quanto a calcreína glandular humana (hK2) estão envolvidas na liquefação do ejaculado quando há mistura dos fluidos provenientes da próstata e vesícula seminal, atuando de forma a degradar as proteínas formadoras de gel, a semenogelina I e II, resultando em resíduos de tirosina e leucina (Lilja, 1985; Lovgren et al., 1997). Uma função de importância do PSA é sua capacidade de atuar como marcador para o câncer de próstata, atuando como forma de diagnóstico para esta enfermidade (Barry et al., 2001).

Outras formas da calcreína, como a KLK-4 – KLK-15 também são utilizadas como marcadores do diagnóstico de câncer ovariano, de mama, próstata e testicular. O KLK-4 – KLK-14 possuem seus genes localizados de forma telomérica à codificação do gene hK2, e o KLK-15 localiza-se entre os genes codificadores da calcreína tecidual e PSA (Yousef e Diamandis, 2001). Fato estes que explicam suas ações como marcadores.

Há correlação positiva entre a fase clínica da doença e a concentração de PSA no soro. A forma predominantemente encontrada desse antígeno é livre, podendo sua atividade catalítica ser inibida pelo zinco, espermina e spermidina, em que o primeiro não atua como inibidor competitivo, enquanto os demais sim (Lilja et al., 1991; Stenman, 1991; Zhang et al., 1995).

Em equinos, a calecreína segregada HPK representa o homólogo da PSA humana (Utleg et al., 2003; Burden et al., 2006). Essa HPK foi isolada a partir de um reprodutor, que apresentou alta concentração de mRNA semelhantes ao PSA, representando 58 – 60 % de aminoácidos (Olsson et al., 2004).

2.2 Criopreservação do Sêmen

Polge e Rowson (1952) obtiveram os primeiros resultados de inseminação artificial com sêmen equino congelado. Em 1950 foi descrito a primeira congelação bem sucedida de células espermáticas do garanhão. Porém, os índices de fertilidade obtidos para espécie equina são inferiores aos de sêmen congelado da espécie bovina (Fürst et al., 2005).

Este resultado pode estar relacionado principalmente aos danos causados ao funcionamento e estrutura da membrana espermática pelo congelamento e descongelamento (Parks e Graham, 1992).

A criopreservação é definida como a preparação de uma suspensão de células para estocagem por meio de congelamento (em temperaturas inferiores a -80 °C), que posteriormente retornam a temperaturas próximas à do organismo. Porém, esta técnica pode acarretar prejuízos à função ou até mesmo a morte celular (Jobim et al., 2011).

Durante o processo de congelamento/descongelamento danos devido a baixas temperaturas podem ocorrer com os espermatozoides, dentre estes se encontram: a formação de cristais de gelo intracelulares, aumento da concentração intracelular de solutos, resultantes da desidratação celular durante o processo de congelamento. As lesões podem ocorrer de forma direta, afetando estruturas celulares, como o rompimento da membrana, ou indiretas, alterando a função metabólica das células (Holt, 2000).

A redução de temperatura promove uma mudança conformacional na membrana plasmática, principalmente quando esta é formada predominantemente por fosfolipídios poliinsaturados, como ocorre nos equinos. Com esta mudança, as extremidades hidrofóbicas tornam-se externas e as hidrofílicas internas, sendo este arranjo conhecido como micela invertida. Este novo formato da membrana plasmática do espermatozoide aumenta a permeabilidade da membrana, formando canais que permitem o influxo de íons e pequenas moléculas, ocasionando desestabilização da membrana (Squires et al., 1999; Watson, 2000). Essa excessiva permeabilidade pode resultar em rompimento da membrana (Amann e Graham, 1992).

Os lipídios sofrem mudança do estado fluido para o estado de gel, tornando mais rígida a cadeia de ácidos graxos (Amann e Graham, 1992). Essas alterações são parcialmente revertidas no descongelamento, contudo, a membrana plasmática é submetida a redistribuições estruturais que envolvem lipídios e as proteínas da membrana (Holt e North, 1984; Holt, 2000).

A formação de cristais de gelo ocorre quando os espermatozoides se encontram em temperatura que varia de aproximadamente -3 e -10°C , sendo neste período indicado uma velocidade de congelação mais rápida (Watson, 2000; Chaveiro et al., 2006). Além da formação de cristais de gelo, esse intervalo proporciona mudanças no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, resultando em desidratação celular. De modo a evitar o congelamento da água intracelular, prescreve-se que a taxa de congelamento neste ponto seja lenta (Squires et al., 1999).

De forma a evitar ou minimizar esses danos causados à célula pelo processo de criopreservação, deve ser utilizado os meios diluidores. Estes são compostos por substâncias capazes de preservar a membrana plasmática por meio da estabilização do pH do meio, neutralização dos produtos tóxicos produzidos pelo espermatozoides, além da proteção contra o choque térmico e de manter o equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibir o crescimento bacteriano e fornecer energia a célula (Furst et al., 2005).

Segundo Medeiros (2007) muitos diluentes vem sendo testados na criopreservação de sêmen em equinos, havendo resultados variáveis na viabilidade espermática e índice de fertilidade. Moreira (2016) relata que uma alternativa ao uso do glicerol no congelamento de sêmen equino, seria a utilização de dimetilformamida isolada ou conjugada ao etilenglicol, minimizando assim, os efeitos deletérios à membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides.

Um cuidado importante com a membrana plasmática deve ser considerado no momento do descongelamento do sêmen, pois esta fase também gera danos celulares, pois é o momento em que a membrana é submetida a rearranjos estruturais que envolvem os lipídeos e as proteínas, havendo também, a passagem da água para o interior da célula e caso esta passagem ocorra de forma rápida pode haver rompimento das membranas (Watson, 1995; Holt, 2000; Borges et al., 2011). Segundo Borges et al. (2011) a fase de descongelamento é tão importante quanto a de congelamento, na formação de metabólitos do oxigênio e na manutenção da viabilidade celular.

3. Referências Bibliográficas

- ALGHAMDI, A.S.; TROEDSSON, M.H.; XUE, J.L.; CRABO, B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post-thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.880-885, 2002.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal funcion. In: MCKINNON, A. O.: VOSS, J. L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p. 715-745. 1992.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H. et al. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.
- AURICH C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.268 –275, 2008.
- BARRY, M. J. Clinical practice. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.344, p.1373–1377, 2001.
- BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 303-314, 2011.
- BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v52, p.863–873, 1999.
- BRAUN, J.; SAKAI, M.; HOCHI, S.; OGURI, N. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. **Theriogenology**, v.41, p.809–818, 1994
- BRINSKO, S.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.
- BROOKS, D.E.; MEANS, A.R.; WRIGHT, E.J.; et al. Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. **European Journal of Biochemistry**, v. 161, p. 13–18, 1986.
- BURDEN, H.P.; HOLMES, C.H.; PERSAD, R.; et al. Prostatomes their effects on human male reproduction and fertility. **Human Reproduction Update**, v.12, p.283–292, 2006.
- CALVETE, J.J.; NESSAU, S.; MANN, K.; et al. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v.29, p.411-426, 1994.
- CARVALHO, A.L.; SANZ, L.; BARETTINO, D.; et al. Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human PSA. **Journal of Molecular Biology**, v.322, p.325–37, 2002.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bulls sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, v. 65, p. 1875-1890, 2006.

DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.7-17, 2003.

EKHALASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFFER, B.; KIRCHHOF, C.; et al. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.45-57, 2005.

ELLERMAN, D. A.; BRANTUA, V. S.; MARTINEZ, S. P.; et al. Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1029–1036, 1998.

FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.46, p.1389-402, 1996

FOSTER, J.A.; GERTON, G.L. Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 221-229, 1996.

FÜRST, R.; CARVALHO, G. R.; FÜRST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v57, p.599-607, 2005.

GAMBOA, S.; RAMALHO-SANTOS, J. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. **Theriogenology**, v.64, p.275-291, 2005.

GARCIA, L.A.D.; BRITO, E.L.R.; SERPA, P.; et al. Horse Seminal Plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility? **Pferdeheilkunde**, v.30, p.557-560, 2014.

GASSET, M.; SAIZ, J.L.; LAYNEZ, J.; SANZ, L.; GENTZEL, M.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine bound complexes. **European Journal of Biochemistry**, v.250, p.735–744, 1997.

GATTI, J.L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V. Post testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.321-39, 2004.

GREUBE, A.; MÜLLER, K.; TÖPFER-PETERSEN, E.; et al. Interaction of Fn type II proteins with membranes: stallion seminal plasma protein SP-1/2. **Biochemistry**, v.43, p.464-472, 2004.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, p.169-180, 2012.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v.69, p.809–815, 2003.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v.75, p.501–507, 2006.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal of Experimental Zoology**, v.230, p.473-483, 1984.

ISACKSON, P.J.; ULLRICH, A.; BRADSHAW, R.A. Mouse 7S nerve growth factor: complete sequence of a cDNA coding for the alpha-subunit precursor and its relationship to serine proteases. **Biochemistry**, v.23, p.5997–6002, 1984.

FORMAS DE CRISP-3, HSP-1 E HSP-2 COMO CANDIDATAS A MARCADORES DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

Resumo

Com este estudo objetivou-se avaliar o perfil proteômico total e diferencial do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador, que apresentam variações na motilidade espermática total após descongelamento, visando identificar proteínas candidatas a marcadores de congelabilidade. Foram utilizados quatro garanhões de fertilidade comprovada divididos em dois tratamentos: T1: alta congelabilidade (n= 4 ejaculados) e T2: baixa congelabilidade (n= 4 ejaculados), sendo cada tratamento composto por dois ejaculados de cada garanhão. As análises físicas do sêmen foram realizadas antes e após a criopreservação do sêmen. Os tratamentos estudados foram divididos pós-descongelamento pela avaliação da motilidade espermática total. O perfil protéico do plasma seminal foi obtido por eletroforese bidimensional, as análises de imagem dos géis foram realizadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare®) e a identificação das proteínas foi realizado por meio de espectrometria de massas usando MALDI-TOF/TOF, com o software Mascot Daemon para a busca em banco de dados. A validação das proteínas identificadas entre os tratamentos foi realizada pelo programa SCAfold (95 %). Os dados foram analisados pela ANOVA com 5 % de probabilidade de erro, correlações simples de Pearson e análise de regressão linear. Observou-se diferença ($p < 0,05$) em relação à motilidade espermática total do sêmen fresco e pós-descongelamento. No perfil protéico identificou-se proteínas com diferenças em abundância ($p < 0,05$) entre os grupos estudados, em que quatro dessas proteínas podem ser consideradas possíveis candidatas a marcadoras de congelabilidade (HSP-1: spot 175; HSP-2: spot 39; CRISP-3: spot 66 e 166). Conclui-se então que os garanhões da raça Mangalarga Marchador apresentam variação individual

ao processo de criopreservação do sêmen e possuem possíveis proteínas candidatas a marcadoras de congelabilidade para raça.

Palavras-chave: criopreservação de sêmen, equinos, proteínas.

1. Introdução

A criopreservação espermática na espécie equina corresponde a um procedimento biotecnológico subutilizado nos criatórios em função da variabilidade individual dos animais em responder ao processo de criopreservação [1, 2]. Por isso, os ejaculados dos equinos podem ser classificados como sendo de alta e baixa congelabilidade, classificação que está relacionada à capacidade dos espermatozoides em resistir aos processos de congelamento [3].

Os testes andrológicos realizados para análise do sêmen, tanto *in natura* quanto pós-descongelamento, não são capazes de identificar animais de alta e baixa congelabilidade. O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [4] determina parâmetros físicos que servem de base para avaliar e classificar os animais em aptos ou inaptos à reprodução e os parâmetros seminais aceitáveis para utilização do sêmen criopreservado.

Segundo Giesecke et al. [5] e Novak et al. [6] mesmo que os garanhões possam ser identificados pelas avaliações convencionais como subférteis, há variações substanciais em sua fertilidade quando avaliada *in vivo*. Esses autores relatam que estudos que apontem possíveis biomarcadores seria promissor para classificar os animais de acordo com sua fertilidade. Adicionalmente, pode-se estender esses estudos visando identificar marcadores para congelabilidade do sêmen.

As proteínas do plasma seminal atuando na congelabilidade dos sêmen dos animais vêm sendo estudada em várias espécies (bovinos, ovinos, búfalos e varão).

Porém, estudos que correlacionem as proteínas do plasma seminal de equinos com a congelabilidade do sêmen ainda são limitados [7], devido ao pouco conhecimento disponível quanto à composição do plasma seminal (PS) e da membrana plasmática [3], principalmente em relação à composição protéica, que apresenta variação individual [8].

As proteínas que contêm o domínio fibronectina tipo II estão presentes de forma abundante no plasma seminal equino (70 a 80 %), família que é denominada HSPs [9, 10, 11]. Também as proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) e as espermedesinas são observadas no plasma seminal de equinos [12].

Vários estudos indicam efeito deletério do plasma seminal de sêmen equino durante o resfriamento e o congelamento. Alguns estudos demonstram que a redução na proporção de plasma seminal para menos de 5 % (v/v) do sêmen durante o resfriamento e o congelamento promove melhora na motilidade espermática pós-descongelamento [13, 14, 15]. Outros autores relataram que a adição de plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade ao sêmen de animais de baixa congelabilidade melhorou a resistência ao processo de congelamento e descongelamento. O oposto também foi demonstrado ser verdadeiro, quando se adicionou sêmen de garanhão de baixa congelabilidade ao de animais com alta congelabilidade [16]. Jobim et al. [7] também verificaram diferenças no perfil protéico entre garanhões de alta e baixa congelabilidade, destacando as proteínas CRISP-3 e HSP-2 como marcadores de alta congelabilidade em equinos.

Propõe-se com este estudo identificar por meio de análise proteômica, o perfil de proteínas do plasma seminal de garanhões classificados como de alta e baixa congelabilidade e correlacioná-las com a criopreservação espermática.

2. Material e Métodos

2.1 Materiais

Os produtos químicos e os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) ou da Bio-Rad Laboratorios (Hercules, CA, EUA), exceto quando citado. Materiais específicos para procedimentos de electroforese foram adquiridos da GE Healthcare (Life Sciences, EUA).

2.2 Animais e Coleta de Sêmen

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG – CEUA/UFV, Processo n.º. 40/2014, em 05/06/2014.

Os ejaculados foram coletados no período de setembro a outubro de 2014. Foram utilizados quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador (A1, A2, B1 e B2), sendo dois garanhões alojados em um haras comercial localizado no município de Muriaé – MG (21° 07' latitude sul; 42° 21' longitude oeste) e os demais no setor de equideocultura (20° 44' latitude sul; 42° 51' longitude oeste) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa – MG. Os animais encontravam-se alojados em baias, com alimentação a base de capim tifton picado fornecido no cocho duas vezes ao dia, juntamente com ração granulada. Nas baias água e sal mineral *ad libitum*. Todos os animais foram avaliados e aprovados para reprodução, de acordo com os parâmetros estabelecidos para sêmen fresco pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [4].

Utilizou-se vagina artificial Modelo Botucatu, com água pré-aquecida a 45 °C para as coletas de sêmen. Foram realizadas duas coletas por garanhão com intervalos de 48 horas, utilizando manequim fixo no haras comercial para obtenção dos ejaculados e de égua em cio natural ou induzido com cipionato de estradiol (E.C.P.® 0,5 mg/kg) ou

dinoprost trometamida (Lutalyse[®] 0,5 mg/kg) para obtenção dos ejaculados no setor de Equideocultura.

2.3 Avaliação Espermática

Imediatamente após as coletas, uma alíquota de 1 mL do ejaculado foi retirada, armazenada em microtubos, submersa e estocada em nitrogênio líquido (-196 °C) para posterior análise proteômica do plasma seminal. O restante do sêmen foi diluído em extensor comercial a base de leite desnatado (BotuSêmen[®] - Botupharma, Botucatu-SP, Brasil), na proporção 1:1 (v/v), para as avaliações seminais: volume do ejaculado (mL), motilidade espermática total (0-100 %), vigor espermático (0-5) e concentração espermática (nº de espermatozoides / mL).

O volume do ejaculado foi obtido por meio de proveta graduada, pré-aquecida a 37 °C. As análises de motilidade espermática total e vigor espermático foram avaliadas usando microscópio de luz, em aumento de 200x, empregando uma amostra de 20 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C.

Para determinar a concentração espermática, uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 950 µL de água destilada (diluição de 1:20), homogeneizada e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

2.4 Desenho Experimental

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, utilizando 04 garanhões, em dois tratamentos (T1 e T2), com dois animais por tratamento e dois ejaculados por animal, perfazendo quatro ejaculados por tratamento. Os animais foram previamente selecionados com base em experimento precedente em que se avaliou as características reprodutivas dos garanhões da raça Mangalarga Marchador de diferentes faixas etárias [17].

Amostras de sêmen dos animais A1 e A2 (dois ejaculados de cada animal), com alta congelabilidade, e dos animais B1 e B2 (dois ejaculados de cada animal), com baixa congelabilidade foram congeladas, e o percentual mínimo de motilidade espermática total para o sêmen descongelado de 35 % foi considerado para classificar o mesmo como de alta congelabilidade; abaixo desse percentual, o sêmen foi classificado como de baixa congelabilidade. Amostras de sêmen criopreservado foram destinadas aos testes de rotina para avaliar a qualidade espermática (motilidade espermática total e vigor espermático), bem como para análises proteômicas do plasma seminal.

2.5 Criopreservação Espermática

Após a diluição, amostras de sêmen foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e 5 µL do pellet foi diluído em 995 µL de água destilada (diluição de 1:200) para o cálculo da concentração por meio de contagem em câmara de Neubauer. O pellet foi então ressuspensionado em diluente comercial de criopreservação a base de glicerol (BotuCrio[®] - Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), em volume suficiente para obter uma concentração espermática final de 100×10^6 espermatozoides/mL.

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL (modelo francesa, IMV[®]), identificadas e lacradas com álcool polivinílico. O sêmen foi então resfriado e estabilizado por 20 minutos a 5 °C. Ao final deste período, as palhetas foram acondicionadas em rampa contida em uma caixa isotérmica permanecendo a 5 cm da lâmina de nitrogênio líquido. Após 15 minutos, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido e estocadas em botijão criogênico a -196 °C [18].

Para o descongelamento, as palhetas foram imersas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e o sêmen foi analisado quanto à motilidade espermática progressiva e ao vigor espermático usando microscopia de luz em aumento de 40 x.

2.6 Teste de Termorresistência

O teste de termorresistência foi realizado mediante avaliação subjetiva da motilidade e do vigor espermático, em microscópio de contraste de fase, nos tempos 0, 30, 60, e 90 minutos após o descongelamento. As amostras permaneceram incubadas em banho-maria a 37 °C.

2.7 Análise Proteômica

2.7.1 Determinação da Concentração de Proteína:

Para a análise proteômica, utilizou-se de quatro géis em cada tratamento (alta e baixa congelabilidade), sendo estes géis formados por dois ejaculados de cada animal. A determinação de proteínas solúveis foi realizada pelo método de Bradford [19], em que a curva padrão foi preparada utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão até 70 µg.

2.7.2 Eletroforese Bidimensional:

Para a primeira dimensão da eletroforese bidimensional (2-DE), a focalização isoeétrica foi realizada em sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare[®]), usando fitas de 7 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG) 3-10 linear. As fitas foram reidratadas por 16 horas com 120 µg de proteína solubilizada em solução de reidratação (7 M de ureia, 2 M de tiourea, 40 mM de ditioneitol (DTT), 0,5 % (v/v) de IPG-buffer pH 3-10 (GE Healthcare[®]) e 2 % (p/v) de 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-propano sulfonato (CHAPS)), adicionada de solução DeStreak (GE Healthcare[®]) para completar 125 µL de amostra. Após hidratação, realizou-se a focalização isoeétrica de acordo com as recomendações do fabricante. Após focalização, as fitas foram incubadas por 15 minutos em solução de equilíbrio (6 M de ureia, 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 30 % (v/v) de glicerol, 2 % (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,002 % (p/v) de azul de bromofenol) contendo 1 % (p/v) de DTT. Seguiu-se re-equilíbrio por mais 15 minutos,

na mesma solução substituindo o DTT por 2,5 % (p/v) de iodoacetamida. Para a segunda dimensão da 2-DE, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 14 %, conforme Laemmli [20] modificado, e as proteínas foram visualizadas seguindo Neuhoff et al. [21] com corante Comassie Coloidal.

2.7.3 Aquisição e Análise das Imagens

As imagens dos géis foram obtidas (300 dpi) usando o equipamento Image Scanner III (GE Healthcare[®]). Os arquivos salvos em formato .mel foram analisados pelo programa Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare[®]). Os géis foram acomodados em dois grupos: animais de alta e de baixa congelabilidade, permanecendo 4 géis em cada tratamento. Um único gel de referência representativo de cada tratamento foi obtido utilizando o conjunto de géis correspondentes às réplicas técnicas, que foram contrastados pelo programa. Proteínas em posições-chave nos géis de referência foram escolhidas como marcos. A correspondência de *spots* entre os géis foi alcançada após várias rodadas de comparações das posições dos *spots* dos géis representativos. Os resultados foram obtidos comparando-se os volumes dos *spots* em cada gel e os volumes dos *spots* foram normalizados considerando-se o volume total dos *spots* no gel. O percentual de cada *spot* foi utilizado para estimar a abundância diferencial da proteína entre as amostras.

2.7.4 Identificação das Proteínas:

Dada a dificuldade em identificar as proteínas do plasma seminal e devido a homologia entre proteínas do plasma seminal em bovinos e equinos, a metodologia empregada para identificação das proteínas foi obtida seguindo o protocolo realizado por Magalhães-Júnior [22], utilizando tripsina (12 ng/ μ L) para digestão das proteínas e

solução de ácido fórmico 55 (v/v) e acetonitrila 50 % (v/v) para extração dos peptídeos e posterior análise em MALDI-TOF/TOF modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

As proteínas foram identificadas usando o programa Mascot Daemon, versão 2.3.3 (Matrix Science, UK), com o banco de dados para a família equidae obtido como subconjunto do banco de dados UniProt [23] (www.uniprot.org/uniprot). Os parâmetros de busca considerados foram no máximo duas clivagens perdidas, a modificação fixa com o resíduo de cisteína foi à carbamidometilação e a modificação variável foi a oxidação dos resíduos de metionina. A massa de peptídeo tolerada foi de 0,1 Da para o íon precursor no espectro de MS e 0,2 Da para fragmentação de íons nos espectros de MS/MS. Para endossar os dados de identificação das proteínas por MS/MS os dados foram avaliados pela sequência manual *de novo*.

A validação estatística das proteínas identificadas foi realizada pelo seu valor de pontuação de $p > 95\%$ na versão 3.0 do Scaffold (Proteome Software, EUA). A identificação das proteínas foi verificada por processo manual. O programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, [24]) foi usado para identificação das sequências, o PeptideCutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/, [25]) para predizer os possíveis pontos de clivagens pela tripsina, Gene Ontology para investigar e categorizar as anotações de ontologia genética (GO – funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos) acessado pelo String (<http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=Jv8JyDvKI44A>, [26]).

2.8 Análise Estatística

Para análise estatística relacionou-se a abundância dos *spots* de proteínas com a motilidade espermática total. Os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para verificação de normalidade e homogeneidade das variâncias,

respectivamente. Todos os dados obtidos atenderam as premissas da ANOVA e foram submetidos ao teste F a 5 % de probabilidade de erro no programa estatístico SAS 9.0 [27]. Para verificação da correlação entre as variáveis, foi realizada análise de correlação simples de Pearson e análise de regressão linear.

3. Resultados

3.1 Motilidade espermática total

A motilidade espermática total do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador não apresentou diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos de alta (T1) e de baixa (T2) congelabilidade. Porém, os resultados do teste de termorresistência (TTR) após o descongelamento mostraram haver diferença ($p<0,05$) entre os animais dos tratamentos T1 e T2 iniciando-se no tempo zero (imediatamente após o descongelamento), perdurando durante os 90 minutos de teste.

Para os animais de T2, os valores de motilidade espermática total durante todo o TTR foram menores ($p<0,05$) do que os valores médios dos animais de T1, e no tempo de 90 minutos, não detectou-se espermatozoides viáveis no T2 (Tabela 1). Essas características diferenciais confirmam que as amostras a serem utilizadas nas análises proteômicas são provenientes de animais contrastantes quanto ao perfil de congelabilidade seminal.

3.2 Análise Proteômica

A separação de amostras do plasma seminal dos equinos classificados como bons e maus congeladores (Figura 1) usando eletroforese bidimensional (2-DE) na região de pH 3 a 10 e SDS-PAGE 14 % permitiu detectar 125 *spots* de proteínas, em média, por gel. Os *spots* com maior intensidade foram retirados dos géis e avaliados por espectrometria de massas em MALDI TOF/TOF, totalizando 36 *spots* analisados, em

que 21 proteínas foram identificadas e a identificação de 17 proteínas foi validada pelo programa Scaffold (Tabela 2).

Dentre as proteínas identificadas, diferentes *spots* representavam proteínas da mesma família que foram as proteínas do plasma seminal 1 (HSP-1, *spots* 32, 33, 47, 53 e 175), proteínas do plasma seminal 2 (HSP-2, *spots* 38, 39, 148 e 149), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP-3, *spots* 66, 166, 169 e 173) e calicreína (KLK1E2, *spots* 92, 151 e 174), e também albumina sérica (ALB, *spot* 123). A faixa de valores para massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) nos tratamentos de alta (T1) e baixa (T2) congelabilidade das famílias de proteínas identificadas estão demonstrados na figura 2.

Os 17 *spots* identificados (Tabela 2) estavam presentes nos géis de todas as replicatas biológicas de ambos os tratamentos (T1 e T2). Quatro proteínas identificadas apresentaram diferença de abundância em relação às demais ($p < 0,05$), sendo uma representante da família das HSP-1 (*spot* 175, com 21.281 Da e pI 3,83) e uma da família HSP-2 (*spot* 39, com 18.371 Da e pI 5,31), com maior abundância em garanhões de alta congelabilidade, e duas da família CRISP-3 (*spots* 66, com 29.267 Da e pI 7,51, e *spot* 166, com 131.853 Da e pI 9,07), o primeiro *spot* com maior abundância em animais de alta congelabilidade (tratamento T1) e o segundo com maior abundância em animais de baixa congelabilidade (tratamento T2, Figura 3).

Para as quatro proteínas com abundância diferencial (HSP-1, HSP-2 e duas CRISP-3) e também para a calicreína (KLK1E2), a comparação dos espectros de massas MALDI-MS1 dos diferentes *spots* das proteínas de mesma família evidenciaram diferenças no padrão dos íons trípticos gerados para as diferentes formas proteicas (Figura Suplementar 1A a 1D).

Para as HSP-1, íons encontrados nos espectros dos *spots* identificados foram especialmente os de massas 877, 1042, 1059, 1102, 1532, 2057, 2058 Da. A sequência do íon 1059 foi identificada em todos os *spots* de HSP-1, enquanto que o íon com 1102 Da não foi localizado apenas no *spot* 175, e o íon 1532 Da foi localizado em todos os *spots* (Figura Suplementar 2A a 2E). O íon 2057 foi localizado apenas para o *spot* 175. Estes resultados demonstram prováveis diferenças nas formas de HSP-1 observadas no presente estudo.

O uso do programa PeptideCutter [25] permitiu evidenciar 12 pontos teóricos de clivagem da tripsina na proteína HSP-1, que correspondem à clivagem nas extremidades carboxílicas de resíduos de lisina ou arginina 23, 33, 41, 44, 50, 56, 69, 78, 86, 92, 101, 118, conforme sublinhados na sequência da proteína (Figura suplementar 2F). Além dos íons encontrados apenas no *spot* 175 e de uma sequência ter sido identificada apenas para este mesmo *spot*, seu valor de pI é menor em animais de alta congelabilidade, grupo T1 (pI 3,77) quando comparado com animais do grupo T2 (pI 3,9) neste *spot* em questão. Diferença entre os valores de pI somada às características descritas acima, podem tornar o *spot* 175, identificado como uma forma de HSP-1, como um candidato a marcador de animais de alta congelabilidade.

A família de HSP-2 apresentou íons comuns aos seus *spots* (1118; 1135; 1136, 1286, 1287 Da). Apenas o espectro 1135 obteve sequência identificada e se apresentava em todos os *spots* de HSP-2 (*spots* 38, 39, 148 e 149). As 13 possíveis posições teóricas de clivagem da tripsina nas proteínas da família HSP-2 correspondem às extremidades carboxílicas de resíduos de lisina ou arginina, conforme sublinhados na sequência da proteína (Figura Suplementar 3).

A CRISP-3 não apresentou espectro similar dentre todos os *spots*, sendo sequenciado o íon 1124 no *spot* 169 e o íon 2227 para identificar os *spots*: 66, 166 e

173. Sua análise pelo PeptideCutter [25] encontrou 24 possíveis pontos de clivagem da tripsina, correspondendo às extremidades carboxílicas de resíduos de lisina ou arginina, conforme sublinhados na sequência da proteína (Figura Suplementar 4). Os *spots* 66 e 166, que apresentaram diferenças na abundância entre os tratamentos T1 e T2, possuem 7 e 8 íons únicos, respectivamente, indicando haver possível diferença entre as proteínas presentes nesses *spots* (66 e 166) e nas proteínas dos demais *spots* identificados para esta família. Juntamente a esses aspectos, no tratamento T1 (alta congelabilidade), os 2 *spots* em questão se diferenciam dos demais pelos valores médio de pI menores, próximos a 7,42 (spot 66) e 8,96 (spot 166), enquanto que no tratamento T2 (baixa congelabilidade), valores encontrados foram pI 7,6 (spot 66) e 9,18 (spot 166). A massa molecular do spot 166 se apresenta maior quando comparada à do spot 66, sugerindo que a proteína CRISP-3 com alta massa molecular (do spot 166) e alto valor de pI pode ser candidata a marcador de animais com sêmen de baixa congelabilidade, enquanto que valores de pI e de massas moleculares menores podem demonstrar animais com sêmen candidatos à alta congelabilidade.

Nos espectros de massas das proteínas da família das calicreínas, identificaram-se os íons 885, 871, 1060, 1066, 1082, 1219, 1220, 1221, 1287, 1365, 1380, 1381, 1382, 2036, 2037, 2038 e 2122 Da, como presentes em todos os *spots* analisados. Porém, apenas dois íons foram sequenciados: 1219 e o 2120. A análise da sequência pelo PeptideCutter [25] encontrou 20 possíveis posições de clivagem pela tripsina (Figura Suplementar 5).

A motilidade espermática total do sêmen pós-descongelamento apresentou correlação positiva com HSP-1 (spot 53, $r=0,79$; spot 175, $r=0,96$), HSP-2 (spot 38, $r=0,75$) e CRISP-3 (spot 66, $r=0,71$) e correlação negativa com a CRISP-3 (spot 166, $r=-$

0,86). Além da motilidade espermática total pós-descongelamento, alguns *spots* com alta abundância, apresentaram correlação entre si (Tabela 3).

A análise de regressão linear mostrou que o spot 166 (CRISP-3) apresentou relação negativa com a motilidade espermática total pós-descongelamento ($\hat{Y} = -116,02X + 71,02$; $R^2=0,67$; $p<0,05$). Enquanto os *spots* 175 (HSP-1) e 66 (CRISP-3) apresentaram relação positiva com a motilidade espermática total (spot 175: $\hat{Y} = 71,4X + 28,76$; $R^2=0,93$; $p<0,0001$; spot 66: $\hat{Y} = 75,78X - 4,60$; $R^2=0,51$; $p<0,05$).

Neste trabalho foram identificadas formas específicas das proteínas HSP-1, HSP-2 e duas CRISP-3 que apresentavam correlação com a motilidade espermática total do sêmen pós-descongelamento, conseqüentemente, com a congelabilidade do sêmen de garanhões, e podem assim ser candidatas a moléculas protéicas que atuariam como marcas moleculares para a baixa ou alta congelabilidade do sêmen.

4. Discussão

No presente estudo, observou-se por meio do teste de termorresistência que os ejaculados de animais da raça Mangalarga Marchador demonstraram variações entre indivíduos quando submetidos ao processo de criopreservação, o que possibilitou a classificação dos ejaculados em grupos de alta e baixa congelabilidade. O presente estudo corroborou com Blottner et al. [28] que verificaram que a qualidade dos parâmetros do sêmen fresco, tanto quanto o grau de injúria celular após o congelamento, apresentam diferenças consideráveis entre garanhões. Os autores afirmam que os animais apresentam diferente susceptibilidade à diluição, resfriamento e congelamento, independentemente da qualidade do sêmen fresco. Alvarenga et al. [29], Gomes et al. [30] e Medeiros [31] trabalharam com animais da raça Mangalarga Marchador e observaram baixas taxas de motilidade espermática total pós-descongelamento, como ocorrido nesse estudo.

Vem sendo relatado que proteínas do plasma seminal encontram-se envolvidas em diferentes funções relacionadas aos espermatozoides e à ligação destes com o ovócito na fêmea durante o processo reprodutivo. Rodríguez-Martínez et al. [32] relataram que vários estudos têm demonstrado a importância de se conhecer as funções das proteínas do plasma seminal nas diferentes espécies de mamíferos. As famílias de proteínas identificadas no plasma seminal são diferentes das encontradas nos espermatozoides, conforme descrito por Swegen et al. [33], que estudaram as proteínas contidas nos espermatozoides equino. No presente estudo, o plasma seminal dos garanhões foi obtido por centrifugação da amostra criopreservada de sêmen total. Apesar da separação do plasma ter sido obtida após essa centrifugação, em nossas análises não houve interferência das proteínas presentes nos espermatozoides, o que pôde ser constatado, visto que, as famílias de proteínas verificadas no plasma seminal são diferentes das observadas nos espermatozoides. Tais observações corroboram as pesquisas realizadas na base de dados Gene Ontology [26] onde relatam que as proteínas identificadas no presente estudo encontram-se no espaço ou região extracelular dos espermatozóides.

O perfil protéico do plasma seminal de garanhões, neste estudo, apresentou maior número de proteínas HSP, corroborando com outros estudos, que relatam que essa família de proteínas está presente em torno de 70 a 80 % do plasma seminal de garanhões [9, 10, 11]. Proteínas da família HSP-1 foram relatadas por Jobim et al. [7] como associadas a garanhões considerados maus congeladores de sêmen. A forma de HSP-1 relatada por esses autores possui 13,9 kDa e pI entre 3,8 e 4,2, não tendo sido citada a identificação da proteína usando o banco de dados UniProt [23], sua sequência peptídica ou seus íons do espectro de massas MS1 presentes na proteína em questão.

No presente estudo, a diferença entre os cinco *spots* identificados como HSP-1 pode estar relacionada com as diferenças obtidas nas análises de massa, pI e íons presentes em cada *spot*. O fato do *spot* 175 ter se apresentado de forma mais abundante em animais de alta congelabilidade pode ser atribuído a possíveis modificações em resíduos de aminoácidos na sequência peptídica, como descrito por Calvete et al. [34].

Levando em consideração a homologia entre as BSPs bovinas e equinas [35, 36], Magalhães-Júnior et al. [22], estudando bovinos da raça Nelore, observaram mais de uma forma de BSP1 presente no plasma seminal dos touros, sugerindo que formas diferentes desta proteína estão envolvidas de formas distintas na criopreservação espermática. Como resultado, eles observaram que proteínas com peso molecular de 15,52 kDa e pI de 5,78 estavam presentes de forma mais abundante em animais de baixa congelabilidade, estando ausente no grupo de alta congelabilidade. No presente estudo, as formas de HSP-1 que possuem alto ponto isoelétrico não demonstraram diferença de expressão entre os tratamentos estudados.

A alta correlação constatada entre o *spot* 175 e a motilidade pós-descongelamento, tanto na correlação de Pearson quanto na análise de regressão linear pode estar relacionada ao fato das proteínas HSPs estarem localizadas na peça intermediária dos espermatozoides, indicando uma possível relação entre este grupo de proteínas e a motilidade espermática [37]. Como a motilidade espermática é regulada pela concentração de cálcio intracelular [38] pode-se inferir que as proteínas desempenham sua função controlando a Ca^{2+} -ATPase [37].

Quanto à HSP-2, o *spot* 39 demonstrou maior abundância em animais de alta congelabilidade, corroborando achados de Jobim et al. [7]. A proteína HSP-2 que apresentou maior abundância possui pI menor (5,31) em relação aos outros três *spots* identificados como a mesma proteína (*spots* 38, 148 e 149). O fato desta proteína estar

mais abundante em animais de alta congelabilidade pode ser resultado dos nove íons únicos presente em sua análise de MS1, porém, esses íons não foram possíveis de ser sequenciados pelo MALDI TOF/TOF para diferenciá-lo dos demais *spots*.

A família das HSP-2 também é citada por Calvete et al. [34] como uma família de proteínas que pode apresentar pequenas mudanças em seus aminoácidos da sequência peptídica. Tais autores descreveram alta similaridade entre as formas estudadas de HSP-2 e HSP-1, mostrando que a sequência de aminoácidos na extremidade N-terminal de HSP-2 se alinha com a de HSP-1 a partir da posição 16 da sequência.

O estudo de Garcia et al. [11] demonstrou que altas concentrações de HSP-1/2 são relacionadas com baixa taxa de fertilidade de garanhões, tanto dentro quanto fora da estação de monta, porém estes autores não citaram os valores de peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas. Novak et al. [6] atribuíram correlação negativa entre a HSP-1/2 com a fertilidade dos garanhões, quando foram encontrados valores de massa de 19,2 kDa para HSP-1 e 14 kDa para HSP-2, diferenciando-se dos nossos resultados em que os valores de massas foram inferiores aos encontrados no estudo destes autores.

Magalhães-Júnior et al. [22] descreveram que há controvérsias quanto à função das BSPs em relação à criopreservação espermática, pois suas diferentes formas podem estar envolvidas de modos distintos no congelamento de sêmen. Este fato pode estar relacionado com as divergências verificadas nos estudos realizados com o plasma seminal equino até o presente momento.

Somadas as diferenças de massa molecular, pI e íons únicos a cada *spot*, o padrão de cargas das proteínas são variáveis, este padrão pode levar a uma modificação na função da proteína. Estudos desenvolvidos por Kumar e Swamy [39] demonstraram que as proteínas HSP1/2 possuem atividade *chaperone* e na presença de cargas

aniônicas e neutras esta atividade aumenta, inibindo a agregação de proteínas. Enquanto cargas catiônicas diminuem a atividade *chaperone* dessas proteínas, resultando em agregação de proteínas. Todas estas alterações podem indicar uma forma de HSP-1 (*spot* 175) e HSP-2 (*spot* 39) como marcador de alta congelabilidade em garanhões da raça Mangalarga Marchador.

Hamann et al. [40] estudaram o polimorfismo dos genes da CRISP-3 associando-os a fertilidade em equinos hannoverianos. Observou-se que a proteína em questão na posição AJ459965:c.+622G>A, conduz à substituição de aminoácidos na posição 208 da proteína CRISP-3, ocorrendo a troca de uma glutamina (codificada por c.+622G) por uma lisina (c.+622A), animais que codificavam tanto para glutamina quanto para lisina, considerados heterozigotos possuíam baixa fertilidade quando comparados a garanhões homozigotos para o alelo. Este relato de Hamann et al. [47] permite observar que uma mudança na codificação da proteína pode alterar a propriedade e a função da CRISP-3, o que poderia ter ocorrido com os *spots* diferencialmente expressos dessa proteína no presente estudo.

Além da possível mudança em sua codificação, o *spot* 166 apresentou alta correlação negativa com a motilidade espermática, demonstrando pelo seu valor de R^2 que sua concentração é inversamente proporcional à motilidade espermática. Assim, essa correlação negativa somada à ocorrência de íons únicos encontrados nesse *spot* e à sua alta massa molecular para garanhões de baixa congelabilidade, infere-se que o *spot* 166 poderá ser candidato a marcador de congelabilidade em garanhões da raça Mangalarga Marchador, visto que, essa proteína encontra-se de forma mais abundante em animais de baixa congelabilidade.

Os três *spots* (92, 151 e 174) identificados como caliceína não apresentaram diferença em abundância nos grupos estudados corroborando com os estudos de Bezerra

[41], em que esta proteína se apresenta nos géis de todos os animais, porém sem apresentar correlação com a congelabilidade em garanhões da raça Mangalarga Marchador. Diferentemente dos resultados observados neste estudo, Jobim et al. [7] relatam que a calicreína encontra-se relacionada com animais de baixa congelabilidade. Esses resultados demonstram que o papel da calicreína na reprodução animal ainda não está elucidado, e que diferentes formas de calicreína podem desempenhar diferentes funções na reprodução animal. Em humanos, essa proteína foi descrita como marcador de câncer de próstata [42, 7], porém nenhum dos animais estudados apresentou distúrbio reprodutivo decorrente de câncer de próstata.

No presente estudo, somente um *spot* (123) foi identificado como albumina sérica. Rêgo [43] e Silva [44] descrevem a presença de *spots* de albumina no plasma seminal de bovinos e carneiros. Este último autor descreve que esta proteína encontrava-se em maior abundância em animais de alta congelabilidade. No presente estudo não houve diferença de abundância desta proteína nos tratamentos estudados, como também não foram identificados relatos na literatura indicando a presença de albumina sérica no plasma seminal de equinos. Alvarez et al. [45] e Rêgo [43] relatam que a função da albumina sérica é a absorção de peróxidos de lipídios, resultando na proteção da membrana e motilidade espermática quanto ao efeito nocivo dos lipoperóxidos.

Os resultados dos cálculos de agrupamento hierárquico, exibidos como dendograma (Figura 2) revelam similaridades entre os animais 1 e 2 (baixa congelabilidade) e os animais 4 e 6 (alta congelabilidade). Revelando ainda maior similaridade nos comportamentos das proteínas HSP-2 (*spot* 39), CRISP-3 (*spot* 66 e 166), com baixa proximidade da proteína HSP-1 (*spot* 175) com as demais proteínas. Esse fato corrobora com os dados obtidos pela base de dados Gene Ontology [26], que

demonstram que as proteínas das diferentes famílias encontram-se relacionadas com funções moleculares similares e participam de processos biológicos comuns. Segundo esta base de dados, as proteínas CRISP-3 e HSP-1 atuam na fertilização e espermatogênese, o que corrobora os resultados de correlação encontrados.

Assim, esse trabalho inicia importantes estudos sobre formas específicas de proteínas do plasma seminal, como as formas identificadas de CRISP-3 (spots 66, com 29.267 Da e pI 7,51, e spot 166, com 131.853 Da e pI 9,07), HSP-1 (spot 175, com 21.281 Da e pI 3,83) e HSP-2 (spot 39, com 18.371 Da e pI 5,31), visando encontrar suas funções específicas e, assim, a importância individual dessas proteínas na congelabilidade do sêmen.

As utilizações da eletroforese bidimensional e do espectrômetro de massa demonstraram eficácia na separação das diferentes formas de proteínas, bem como em sua identificação. Estas técnicas vêm sendo utilizadas ao longo dos anos por diversos autores, tais como: Jobim et al. [7], Rêgo [43], Silva [44] e Bezerra [41] com resultados satisfatórios na separação de proteínas de diferentes espécies.

5. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo pela análise da motilidade espermática total e do agrupamento hierárquico demonstram variações individuais entre os garanhões da raça Mangalarga Marchador ao processo de criopreservação espermática e a presença de proteínas no plasma seminal de garanhões que podem influenciar na estabilidade do processo, permitindo inferir sobre a possibilidade de estudo dessas proteínas visando identificar marcadores moleculares protéicos para auxiliar na seleção de reprodutores doadores de sêmen para criopreservação. As proteínas identificadas como HSP-1 (*spot* 175), HSP-2 (*spot* 39) e CRISP-3 (*spot* 66 e

166) são consideradas candidatas a marcadoras de congelabilidade para animais com sêmen de alta e baixa congelabilidade.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Samper JC, Morris CA. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*, 1998;49:895–03.
- [2] Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci*, 2008;105:119–28.
- [3] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci*, 2008;107:268–75.
- [4] CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Third edition. Belo Horizonte: CBRA; 2013. p. 104.
- [5] Giesecke K, Hamann H, Sieme H, Disti O. INHBA-associated markers as candidates for stallion fertility. *Reprod Domest Anim*, 2010;45:342-7.
- [6] Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, et al. Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology*, 2010;74:956–67.
- [7] Jobim MIM, Trein C, Zirkler H, Gregory RM, Sieme H, Mattos RC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 2011;76:765-71.
- [8] Zahn FS, Papa FO, Melo CM. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability? *Anim Reprod Sci*, 2006;94:64-6.
- [9] Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci*, 2005;89:159-70.
- [10] Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Pol J Vet Sci*, 2011;14:489–99.
- [11] Garcia LAD, Brito ELR, Serpa P, Gregory J, Natalini C, Mattos RC, et al. Horse Seminal Plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility? *Pferd*, 2014;30:557-60.
- [12] Kareskoski M, Katila T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci*, 2008;107:249-56.

- [13] Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL. Effects of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, 1991;35:1059-67.
- [14] Braun J, Sakai M, Hochi S, Oguri N. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 1994;41:809–18.
- [15] Alghamdi AS, Troedsson MH, Xue JL, Crabo BG. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post-thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *Am. J. Vet. Res.*, 2002;63:880-85.
- [16] Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, 1996;46:791-97.
- [17] Oliveira RR. Características reprodutivas de garanhões da raça Mangalarga Marchador em diferentes faixas etárias. Dados não publicados. (<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1889?show=full>); 2014 [acesso 21.04.17].
- [18] Terraciano PB, Bustamante-Filho IC, Miquelito LV, Arlas TR, Castro F, Mattos RC, et al. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Cienc Rural*, 2008;38:1972-77.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [20] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;227:680–85.
- [21] Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 1988;9:255–62.
- [22] Magalhães-Júnior MJ, Martins LF, Senra RL, Santos TF, Okano DS, Pereira PRG, et al. Differential abundances of four forms of Binder of Sperm 1 in the seminal plasma of *Bos taurus indicus* bulls with different patterns of semen freezability. *Theriogenology*, 2016;86:766-77.
- [23] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bairoch A. Uni-ProtKB/Swiss-Prot. The Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase. In: Edwards D, editor. *Plant Bioinformatics: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press. *Methods Mol Biol* 2007;406:89–112.
- [24] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–402.

- [25] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, editor. The proteomics Protocols Handbook. New Jersey: Humana Press; 2005. p. 571–607.
- [26] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 2015;43:447-52.
- [27] SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT[®] 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- [28] Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Tomer H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci*, 2001;65:75-8.
- [29] Alvarenga MA, Papa FO, Buratini-Júnior J. The effect of breed and spermatoc parameters over equine semen freezability. In: Symposium on Stallion Semen, 1996, Amersfoort. Proceedings... Amesterfoort, SSS, 1996. p.82. (Abstract).
- [30] Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative crioprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, 2002;58:277-79.
- [31] Medeiros ASL. Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores. Dados não publicados. (https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105986/medeiros_asl_dr_botfmvz.pdf?sequence=1); 2007 [acesso: 21.04.17].
- [32] Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins: What role do they play? *Am J Reprod Immunol*, 2011;66:11-22.
- [33] Swegen A, Curry BJ, Gibb Z, Lambourne SR, Smith ND, Aitken RJ. Investigation of the stallion sperm proteome by mass spectrometry. *Reprod Res*, 2015;149:235-44.
- [34] Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, et al. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod Dom Anim*, 1994;29:411-26.
- [35] Greube A, Müller K, Töpfer-Petersen E, Herrmann A, Müller P. Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: the stallion seminal plasma protein SP-1/2. *Bioch*, 2004;43:464-72.
- [36] Calvete JJ, Sanz L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Soc Reprod Fertil*, 2007;65:201-15.
- [37] Srivastava N, Jerome A, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A. Bovine seminal PDC-109 protein: an overview of biochemical and functional properties. *Anim Reprod Sci* 2013;138:1–13.

- [38] Breitbart H, Rubinstein S, Nass-Arden L. The role of calcium and Ca²⁺-ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J Biol Chem*, 1985;122:11548–53.
- [39] Kumar CS, Swamy MJ. Differential modulation of the chaperone-like activity of HSP1/2, a major protein of horse seminal plasma by anionic and cationic surfactants. *Int J Biol Macromol*, 2017;96:524-31.
- [40] Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Töpfer-Petersen E, Distl O, et al. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim Genet*, 2007;38:259–64.
- [41] Bezerra LL. Análise bioquímica e proteômica do plasma seminal equino e sua relação com a criopreservação do sêmen. Dados não publicados. (<http://locus.ufv.br/handle/123456789/7546>); 2015. [acesso: 21.04.17].
- [42] Carvalho AL, Sanz L, Baretino D, Romero A, Calvete JJ, Romão MJ. Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human PSA. *J Mol Biol*, 2002;322:325–37.
- [43] Rego JPA, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci* 2014;148:1-17.
- [44] Silva TASN. Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos. Dados não publicados. (http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/18078/1/2014_ThiagoAntoniodeSouzaNascimentoSilva.pdf); 2014. [acesso: 21.04.17].
- [45] Alavarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 1995;42:334-46.

Tabela 1: Valores médios e erros padrão dos parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador pré-congelamento e pós-descongelamento em diferentes tempos de incubação no teste de termorressistência (37 °C)

Grupo	Motf (%)	CV	M0(%)	CV	M30(%)	CV	M60(%)	CV	M90(%)	CV
Alta	85,00 ± 2,74 ^a	6,4	49,00 ± 4,85 ^a	49,8	44,00 ± 3,67 ^a	16,0	27,00 ± 5,61 ^a	41	24,00 ± 6,20 ^a	52
Baixa	78,75 ± 3,15 ^a	8,0	16,25 ± 5,54 ^b	68,0	05,00 ± 2,04 ^b	82,0	02,50 ± 1,44 ^b	115,0	00,00 ± 0,00 ^b	

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste F.; Motf: motilidade espermática do sêmen fresco; CV: coeficiente de variação; M0: motilidade espermática no tempo 0 pós-descongelamento; M30: motilidade espermática no tempo 30 minutos pós-descongelamento; M60: motilidade espermática no tempo 60 minutos pós-descongelamento; M90: motilidade espermática no tempo 90 minutos pós-descongelamento;

Tabela 2: Identificação de proteínas* extraídas do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador, com sêmen de alta e baixa congelabilidade

spot ID	Nome da Proteína	Banco de dados	Acesso	Score de identificação o MS (Obs/Esp)	Prob. (1)	Cobertura da sequência (%)	Teórico		Experimental		NPIV (3)	Sequência dos peptídeos	Prob. (2)	Íon
							MM	pI	MM	pI				
32	Horse Seminal Protein- 1 (HSP-1)	Equidae UniProt	P81121	94/30	99%	11	13905	8,14	18063	7,76	01	(R)WCSLTGTYSGSWK(Y)	97%	1532
33	Horse Seminal Protein- 1 (HSP-1)	Equidae UniProt	P81121	139/25	100%	13	13905	8,14	17745	8,27	02	(K)CVFPFNRYR(G)	96%	1102
												(K)CAFPPVYR(G)	95%	1059
47	Horse Seminal Protein- 1 (HSP-1)	Equidae UniProt	P81121	104/30	99%	13	13905	8,14	21095	4,51	01	(K)CAFPPVYR(G)	96%	1059
53	Horse Seminal Protein- 1 (HSP-1)	Equidae UniProt	P81121	130/31	100%	13	13905	8,14	20978	3,50	02	(K)CVFPFNRYR(G)	95%	1102
												(K)CAFPPVYR(G)	98%	1059
175	Horse Seminal Protein- 1 (HSP-1)	Equidae UniProt	P81121	376/30	100%	32	13905	8,14	21281	3,83	03	(R)WCSLTGTYSGSWK(Y)	100%	1532
												(K)CAFPPVYR(G)	96%	1059
												(R)ISWCSVTPNYDHHGAWK(Y)	99%	2057
38	Horse Seminal Protein – 2 (HSP-2)	Equidae UniProt	F6XU34	53/31	95%	6,1	15609	6,92	18061	6,08	01	(K)CFFPFVYR(G)	97%	1135
39	Horse Seminal Protein – 2 (HSP-2)	Equidae UniProt	F6XU34	50/31	95%	6	15609	6,92	18371	5,31	01	(K)CFFPFVYR(G)	96%	1135
148	Horse Seminal Protein – 2 (HSP-2)	Equidae UniProt	F6XU34	49/31	95%	6,0	15609	6,92	18159	6,65	01	(K)CFFPFVYR(G)	96%	1135
149	Horse Seminal Protein – 2 (HSP-2)	Equidae UniProt	F6XU34	54/30	95%	6,0	15609	6,92	19682	5,32	01	(K)CFFPFVYR(G)	97%	1135
66	Cysteine-rich	Equidae	F7BWJ9	139/29	98%	7,8	27306	7,83	29267	7,51	01	(K)TPNAVVGHYTQVVWYSSYR(V	100%	2227

	secretory protein 3 (CRISP-3)	UniProt)		
166	Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3)	Equidae UniProt	F7BWJ9	67/30	95%	8	27306	7,83	131853	9,07	01	(K)TPNAVVGHYTQVVWYSSYR(V)	99%	2227
169	Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3)	Equidae UniProt	F7BWJ9	47/28	95%	4,1	27306	7,83	27299	9,31	01	(R)VGCGIAYCPK(Q)	96%	1124
173	Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3)	Equidae UniProt	F7BWJ9	48/27	95%	8	27306	7,83	128718	9,26	01	(K)TPNAVVGHYTQVVWYSSYR(V)	97%	2227
92	Kallikrein 1E2	Equidae UniProt	Q6H321	285/30	100%	22	29392	5,40	31017	5,35	03	(K)YLRPYDDISHDLMLLR(L)	97%	2036
												(K)LGSTCYTSGWGLISTFTNR(G)	100%	2121
												(K)MTEFVLCATHR(D)	99%	1380
151	Kallikrein 1E2	Equidae UniProt	Q6H321	376/30	100%	25	29392	5,40	28571	5,77	05	(R)IIGGWECEK(H)	97%	1091
												(K)YLRPYDDISHDLMLLR(L)	99%	2036
												(K)LGSTCYTSGWGLISTFTNR(G)	100%	2120
												(R)GSGTLQCVELR(L)	99%	1219
												(K)MTEFVLCATHR(D)	99%	1380
174	Kallikrein 1E2	Equidae UniProt	Q6H321	171/28	100%	13	29392	5,40	28557,5	5,55	02	(K)YLRPYDDISHDLMLLR(L)	98%	2036
												(K)LGSTCYTSGWGLISTFTNR(G)	100%	2121
123	Albumina Sérica	Equidae UniProt	F7BAY6	131/29	100%	4,1	68372	5,78	31348	7,35	02	(K)DVFLGTFLYEYSR(R)	99%	1609
												(R)RHPDYSVSLLLR(I)	99%	1455

* As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional, analisadas por espectrometria de massas em equipamento MALDI TOF/TOF, e identificadas usando algoritmo MASCOT e validadas usando o software SCAFFOLD contra o banco de dados Equidae UniProt. Legenda: (1) Probabilidade de identificação da proteína (MASCOT); (2) Probabilidade de identificação para peptídeo (Scaffold); (3) NPIV – Número de peptídeos identificados e validados (Scaffold); MM= massa molecular, unidade Da.

Tabela 3: Correlação simples de Pearson entre motilidade pós-descongelamento (Motd) e os spots de proteína: S38, S39, S53, S66, S166 e S 175 do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Variáveis	Motd	Spot 38 (HSP-2)	Spot 39 (HSP-2)	Spot 53 (HSP-1)	Spot 66 (CRISP-3)	Spot 166 (CRISP-3)	Spot 175 (HSP-1)
Motd	1	0,75	ns	0,79	0,71	-0,82	0,96
Spot 38 (HSP-2)		1	ns	0,73	ns	ns	ns
Spot 39 (HSP-2)			1	ns	0,86	-0,86	ns
Spot 53 (HSP-1)				1	ns	-0,86	0,77
Spot 66 (CRISP-3)					1	-0,86	ns
Spot 166 (CRISP-3)						1	-0,76
Spot 175 (HSP-1)							1

ns: não significativo ($p > 0,05$).

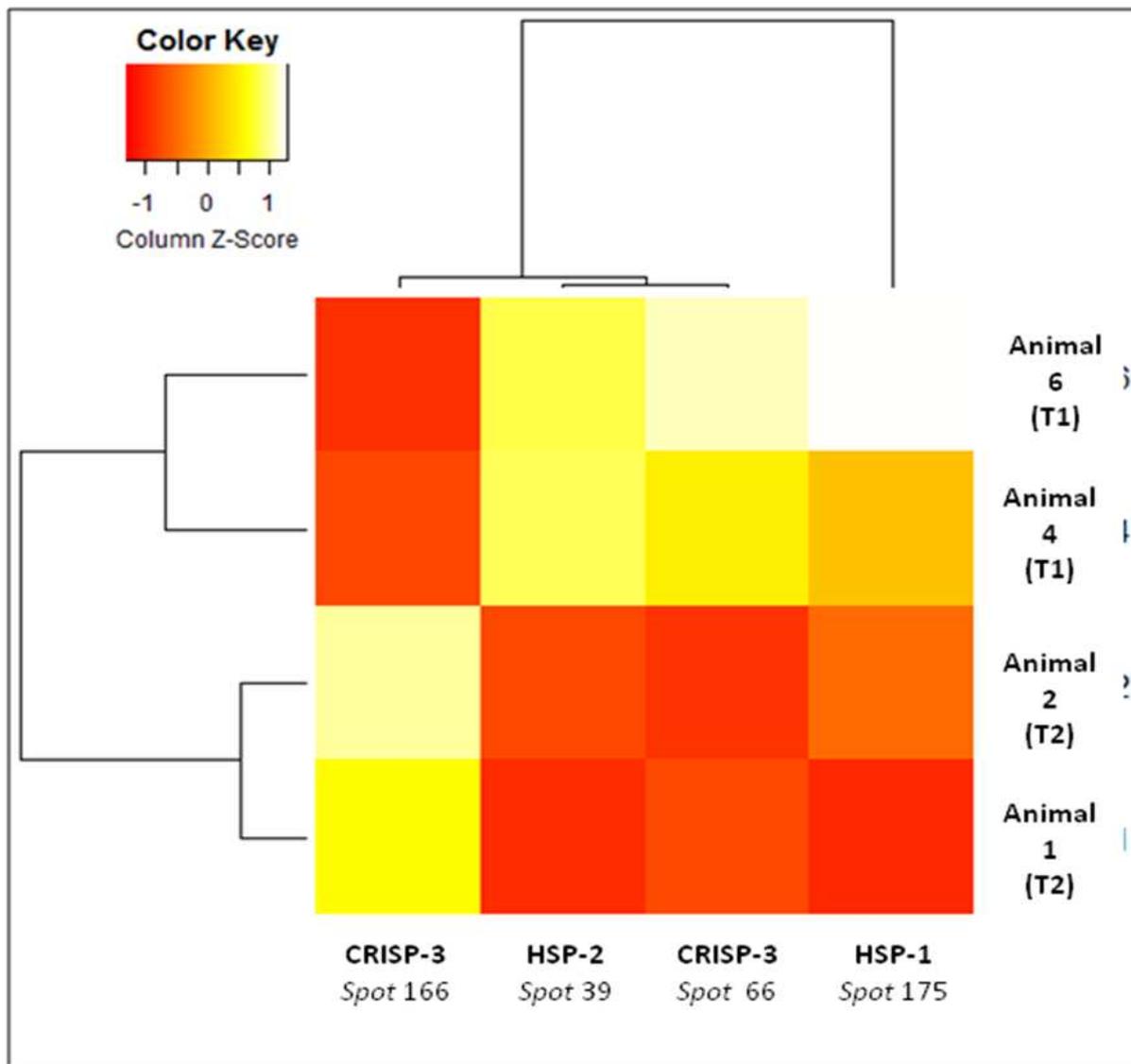


Figura 2: Abundância entre os animais e os spots, obtidos por eletroforese bidimensional do plasma seminal de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador pós-descongelamento (T1= alto congelamento; T2= baixo congelamento). No heatmap, cores escuras representam baixa abundância de proteína e cores claras alta abundância de proteínas.

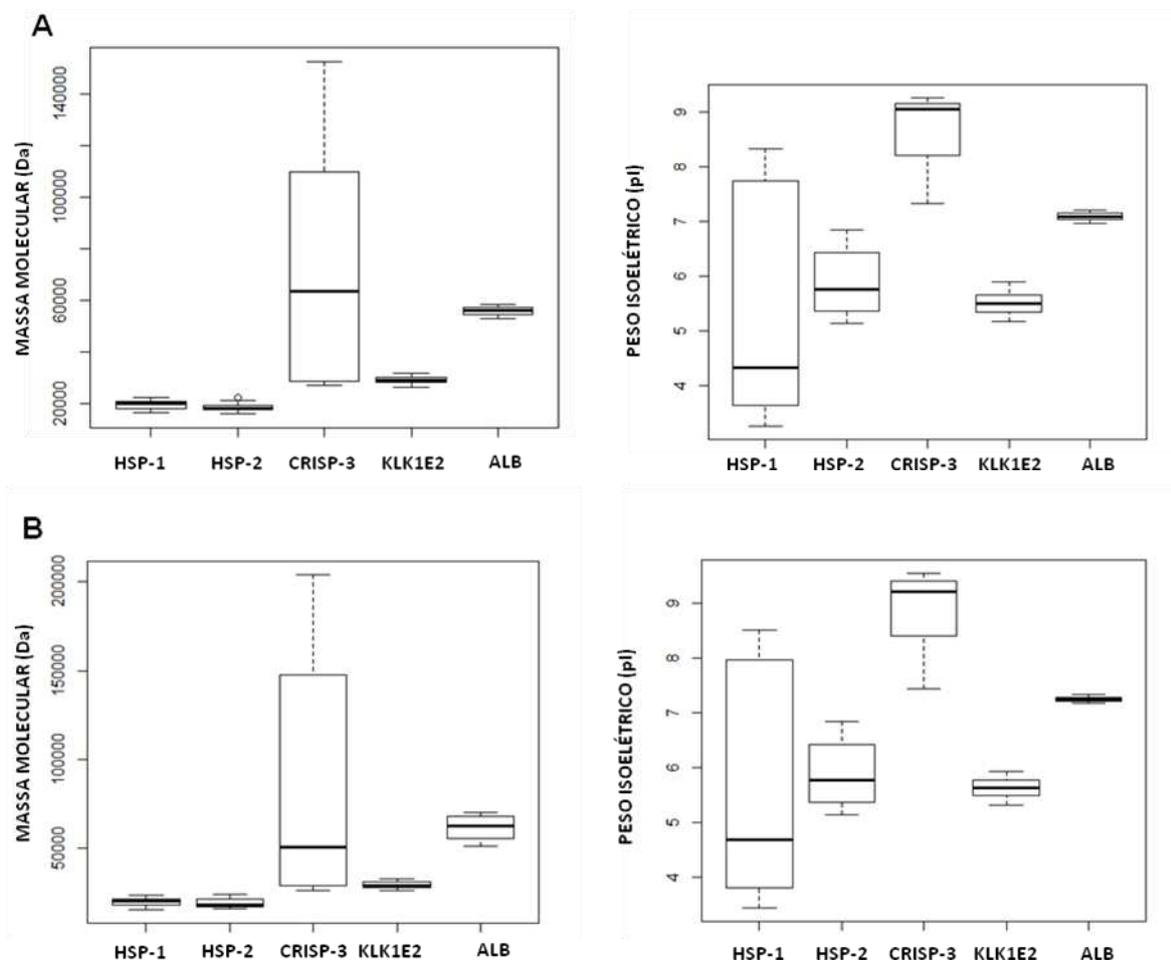
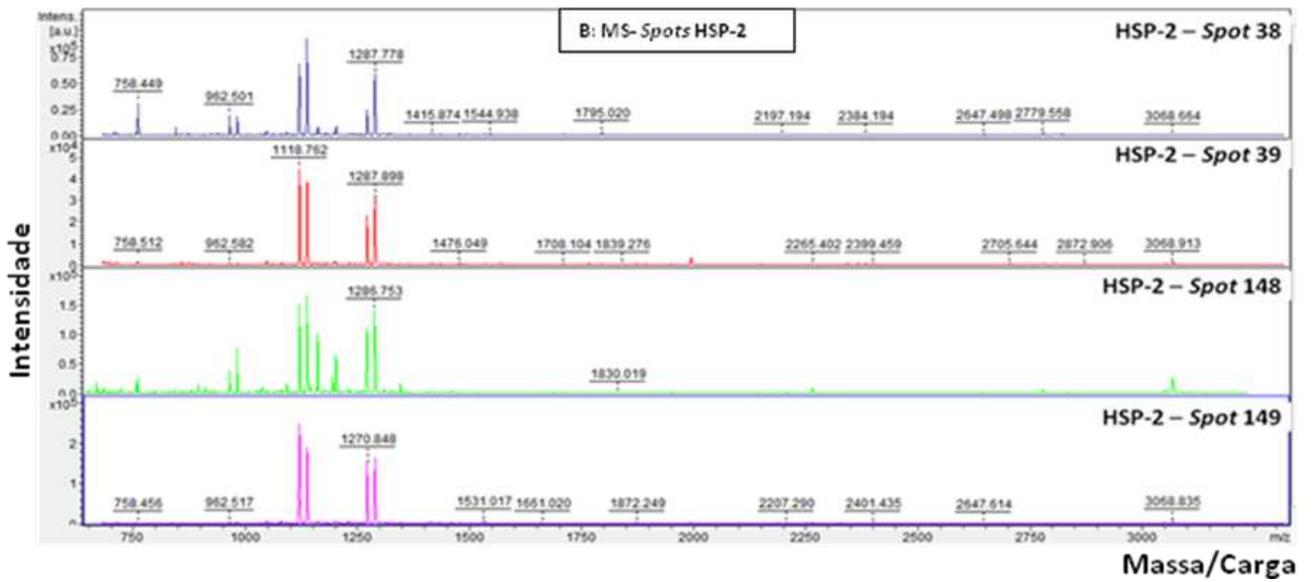
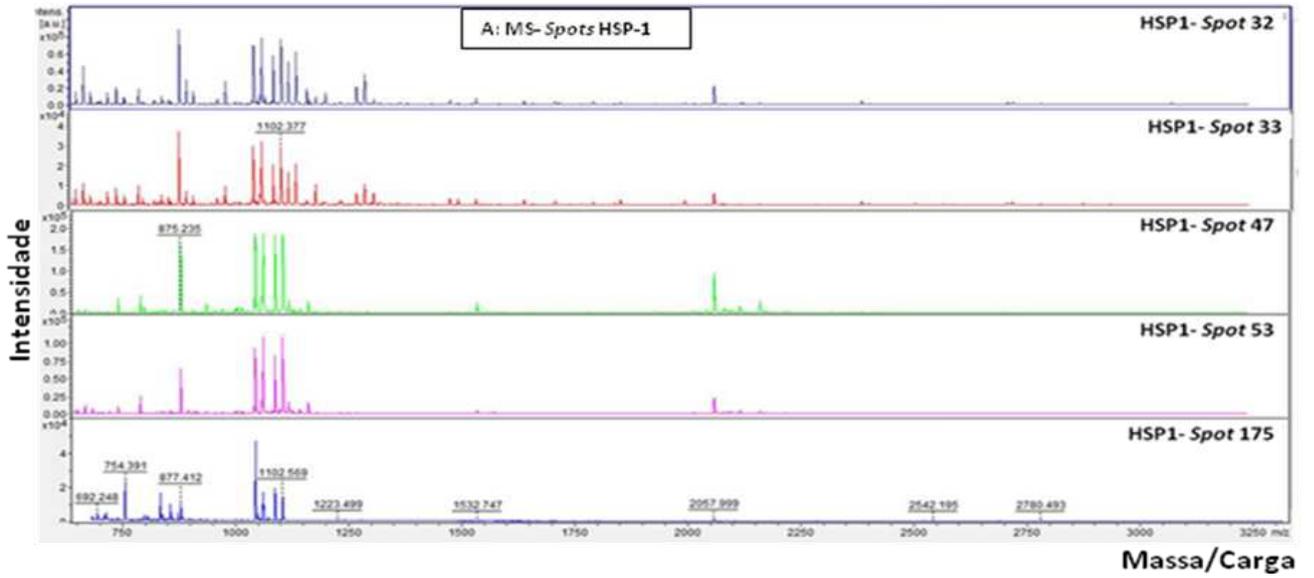


Figura 3: Boxplot da mediana da massa molecular e ponto isoeletrico das famílias de proteínas identificadas, sendo A: valores de mediana referente a massa molecular e ponto isoeletrico das proteínas do tratamento de alta congelabilidade; B: valores de mediana referente a massa molecular e ponto isoeletrico das proteínas do tratamento de baixa congelabilidade.

Material Suplementar



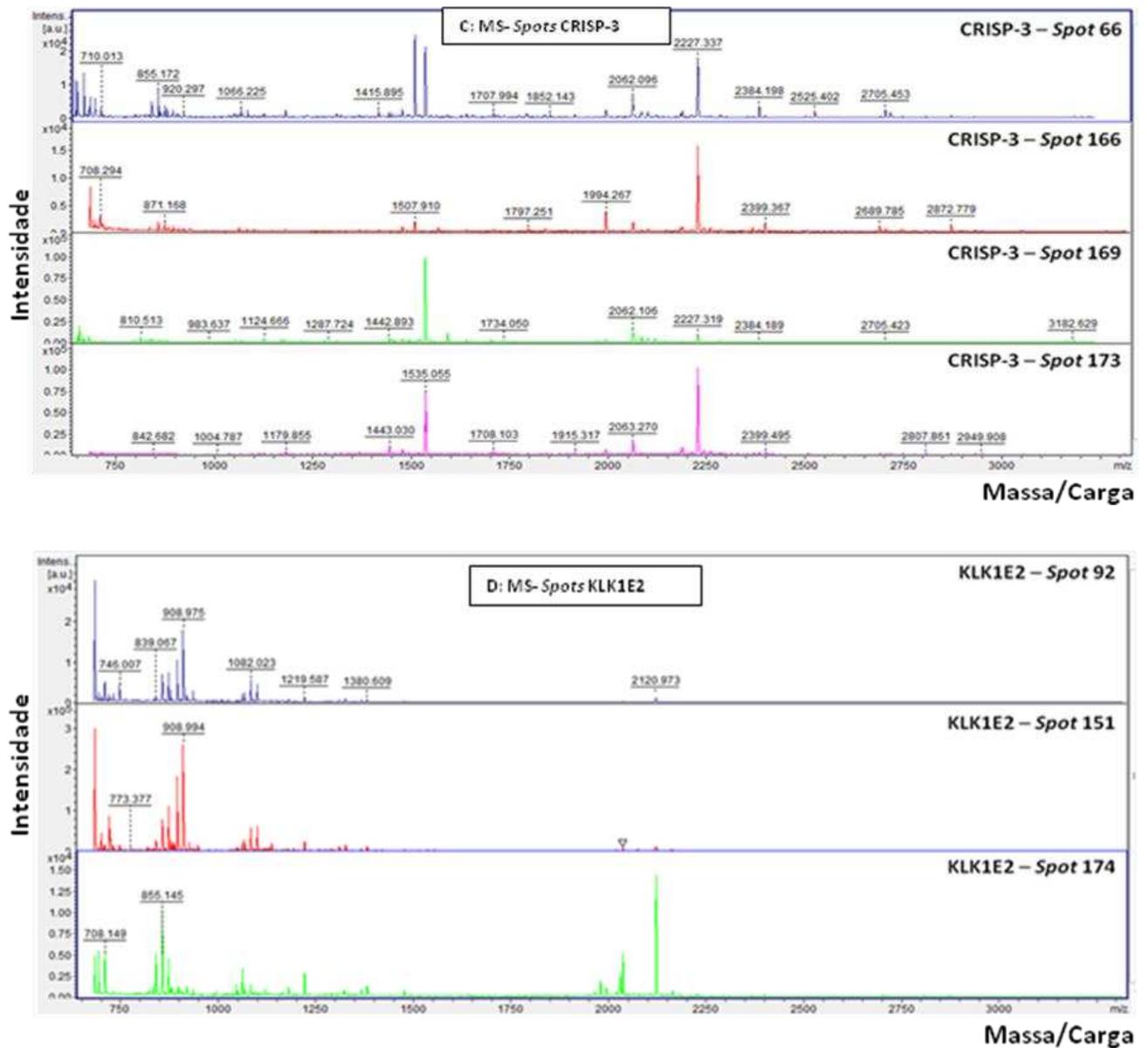
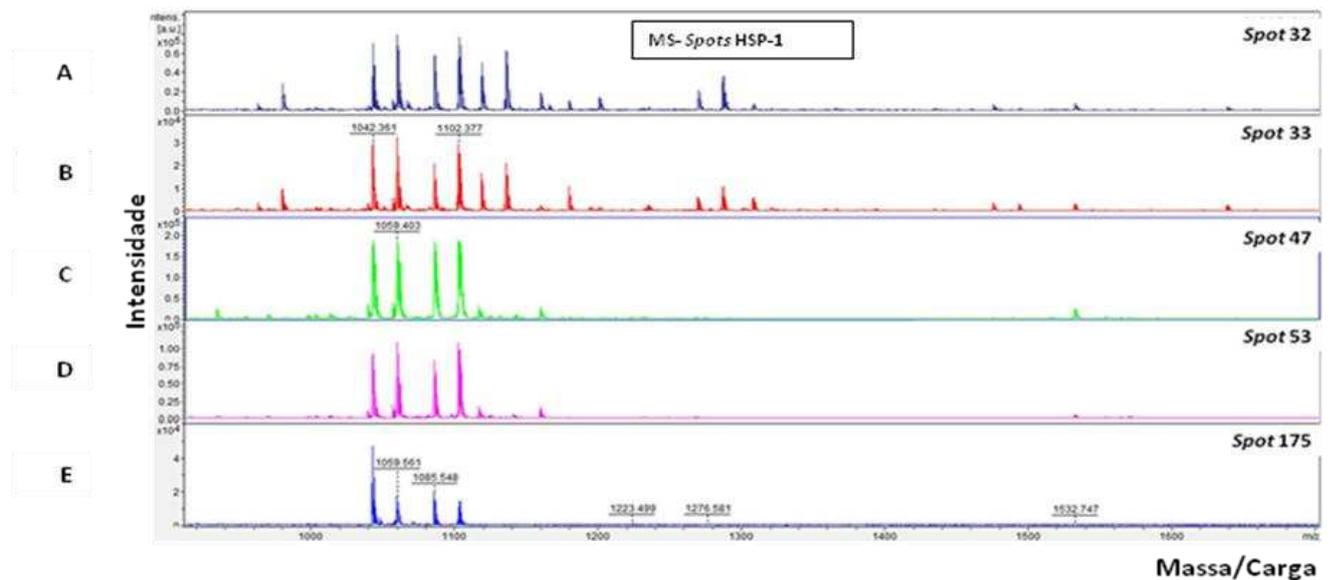
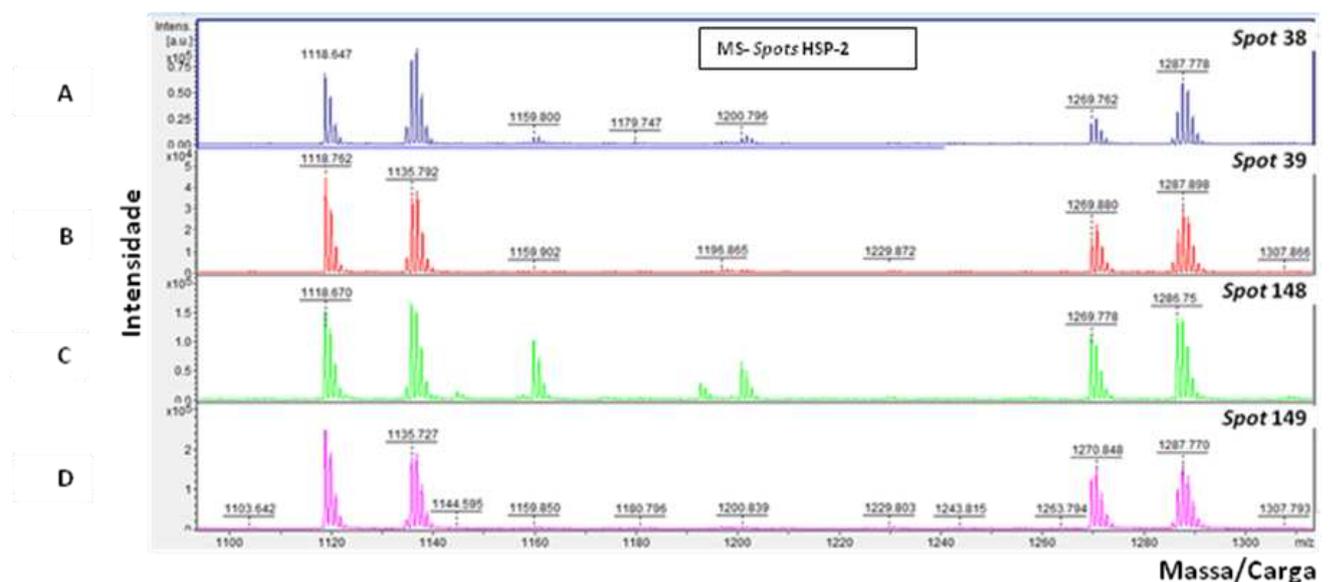


Figura Suplementar 1: Perfil de Espectrometria de Massa (MS) das proteínas tripsinizadas e identificadas: **A:** HSP-1, **B:** HSP-2, **C:** CRISP-3 e **D:** KLK1E2, respectivamente, do plasma seminal de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador.



F: 1 DLQTTGADHS ATVNPDQLI MTKHSATVTP ENKCVFPFNYRGYRYDCTRTDSFYRWCSL 60
 61 TGTYSGSWKCAATDYAKCAFPFVRRGQTDRCTTDGSLF RISWCSVTPN YDHHGAWKYC 120

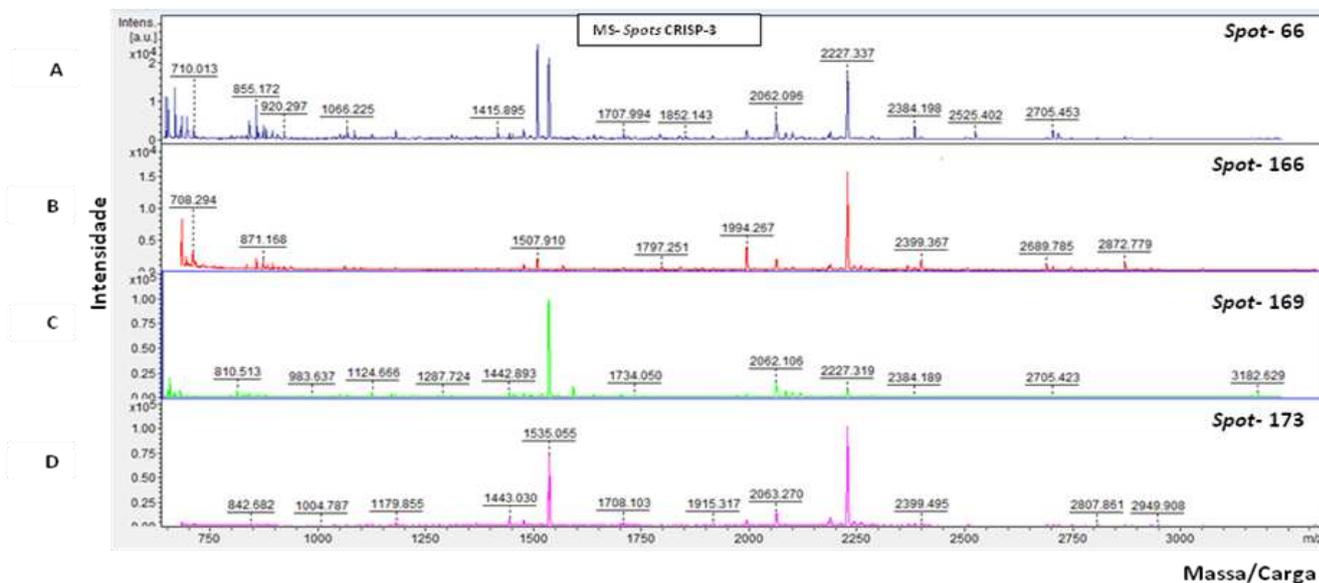
Figura Suplementar 2: **A:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 32; **B:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 33; **C:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 47; **D:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 53; **E:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 175; **F:** pontos teóricos de clivagem da tripsina na proteína HSP-1, que correspondem à clivagem nas extremidades carboxílicas de resíduos de lisina ou arginina em ganhões da raça Mangalarga Marchador



E: 1 MALHLGVFLI WAGVCIFLQL DHVDGDQQQI VNDHSSTRKPDNKCVFPFKYQGRQYYDCTR 60
 61 TDSFHRWCSL TENYSGKWRY CVAEDYAKCFPFVRGRTYHTCTTDESFF LIPWCSVTPN 120
 121 YDRDGGWKYCM 131

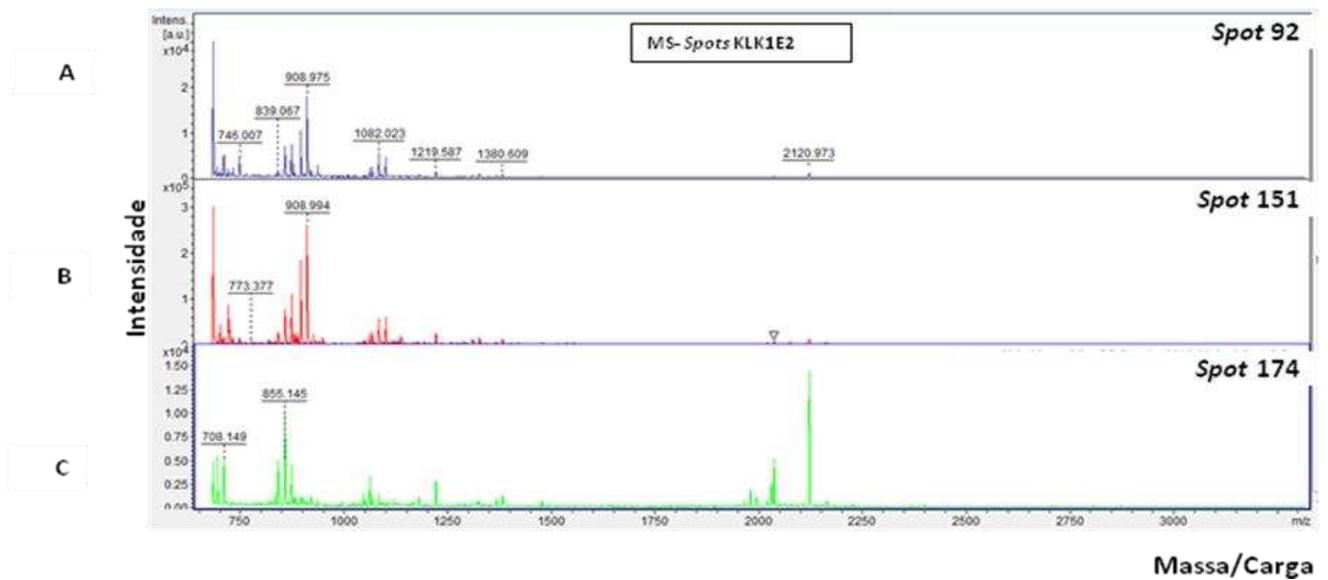
Figura Suplementar 3: **A:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 38; **B:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 39; **C:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot*

148; **D**: Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 149; **E**: Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 175; **F**: pontos teóricos de clivagem da tripsina na proteína HSP-2, que correspondem à clivagem nas extremidades carboxílicas de resíduos de lisina ou arginina em ganhões da raça Mangalarga Marchador



E: 1	MALLP <u>V</u> LLFL AAVLLPFFPA SGQDPGFAAL SIT <u>K</u> SEVQ <u>K</u> E IVN <u>K</u> HNDLRR TVSP <u>L</u> ASNML	60
61	<u>K</u> MQWDS <u>K</u> TAT NAQNWAN <u>K</u> CL LQHS <u>K</u> AEDRA VGT <u>M</u> <u>K</u> CGENL FMSSIPNSWS DAIQNWHDEV	120
121	HDF <u>K</u> YGVG <u>P</u> <u>K</u> TPNAVVGHYT QVVWYSS <u>R</u> V GCGIAYCP <u>K</u> Q GTL <u>K</u> YYYVCQ YCPAGNYVN <u>K</u>	180
181	INTPYEQGTP CARCPGNCDN GLCTNSCEYE DLVSNCD <u>S</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>K</u> IAGCEHELL <u>K</u> EN <u>C</u> <u>K</u> AT <u>C</u> <u>R</u> <u>C</u>	240
241	EN <u>K</u> IY	245

Figura Suplementar 4: **A**: Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 66; **B**: Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 166; **C**: Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 169; **D**: Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 173; **E**: Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 175; **F**: pontos teóricos de clivagem da tripsina na proteína CRISP-3, que correspondem à clivagem nas extremidades carboxílicas de resíduos de lisina ou arginina em ganhões da raça Mangalarga Marchador



D: 1	MWFLVLC	LDL	SLGETGALPP	IQSRIIGGWE	CEKHSK	PWQV	AVYHQGHFQC	GGVLVHPQWV	60	
61	LTA	AHCMSDD	YQIWLGR	HNL	SEDEDTAQFH	QVSDSFLDPQ	FDLSLLK	KKY	LRPYDDISHD	120
121	LMLLRLA	QPA	RITDAVK	IILD	LPTQEPK	LGS	TCYTSWGLI	STFTNRGSGT	LQCVELRLQS	180
181	NEK	CARAYPE	KMTEFVLCAT	HRDDSGSICL	GDSGGALICD	GVFQGITSWG	YSECADFNDN		240	
241	FVFTK	VMPHL	KWIKETIEK	NS					261	

Figura Suplementar 5: **A:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 92; **B:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 151; **C:** Perfil de fragmentação (MS/MS) dos íons do *spot* 174; **D:** pontos teóricos de clivagem da tripsina na proteína KLK1E2, que correspondem à clivagem nas extremidades carboxílicas de resíduos de lisina ou arginina em ganhões da raça Mangalarga Marchador