

LUCIANA DE LIMA BEZERRA

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL  
EQUINO E SUA RELAÇÃO COM A CRIOPRESERVAÇÃO DO  
SÊMEN**

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  
2015

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

T

B574a Bezerra, Luciana de Lima, 1979-  
2015 Análise bioquímica e proteômica do plasma seminal equino  
e sua relação com a criopreservação do sêmen / Luciana de Lima  
Bezerra. – Viçosa, MG, 2015.  
x, 113f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cavalo - Reprodução. 2. Sêmen - Criopreservação.  
3. Plasma seminal - Constituição. 4. Espectrometria de massa.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.1

LUCIANA DE LIMA BEZERRA

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL EQUINO  
E SUA RELAÇÃO COM A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN**

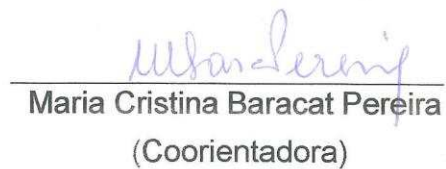
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

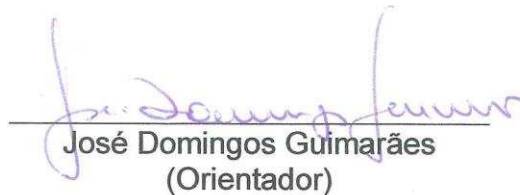
APROVADA: 31 de julho de 2015.

  
Júlio César Ferraz Jacob

  
Ciro Alexandre Alves Torres

  
Rogério Oliveira Pinho

  
Maria Cristina Baracat Pereira  
(Coorientadora)

  
José Domingos Guimarães  
(Orientador)

“Dedico a minha família  
pelo apoio,  
incentivo e participação a cada conquista,  
consolaram-me frente às dificuldades, deram-me a  
força necessária para continuar em busca do meu  
sonho, fornecendo-me a segurança e a paz do  
mais sublime amor, sendo fundamentais em todos  
os momentos da minha vida...  
AMO MUITO VOCÊS!!!”

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me ensinar que a cada dia posso superar medos e obstáculos, recomeçar, crescer e aprender.

Aos meus pais, José Fernandes Bezerra e Isaira Rosa de Lima Bezerra que incansavelmente em todos os momentos abdicaram de suas vidas para que este objetivo fosse alcançado.

Ao meu filho Lucas, minhas irmãs Ana e Mônica pelo amor, carinho, incentivo e compreensão pelas ausências.

Ao professor José Domingos Guimarães, pela oportunidade, ensinamentos, compreensão, auxílio e amizade.

À professora Dra. Maria Cristina Baracat Pereira, pelo carinho, acolhimento, coorientação, ensinamentos e colaboração no experimento.

Às amigas Alessandra e Vivian, pelo incentivo, apoio e carinho que jamais serão esquecidos.

À amiga Bruna e a família Waddington, por todo carinho e ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal (Camila, Lincoln, Paula, Amanda, Faider, Hugo, Rogério, Denise, Victor, Jhonata, Alberto, Priscilla, Daniel, Taynan) e ao meu grande amigo e irmão de Minas Gerais Breno, por todos os momentos inesquecíveis durante o doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica (Renato, Rafael, Eloi, Lanna e Patrícia) e principalmente ao Marcos Jorge, por todo carinho, ajuda e contribuição para a execução dessa pesquisa.

À Flávia, amiga que a todo o momento disponível, esteve empenhada em ajudar e incentivar as análises proteômicas.

Ao Sr. Divino e todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária.

À Rosi pelo carinho, dedicação e incentivo, a todos os alunos da pós-graduação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Medicina Veterinária pelo acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante parte do doutorado.

Aos animais que participaram da parte experimental, pois sem eles todo o trabalho não teria sido realizado, e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade  
(Albert Einstein)”*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO .....	1
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Plasma Seminal .....	3
2.1.1. Composição proteica do plasma seminal.....	6
2.1.1.1. Proteínas ricas em cisteína (CRISPs) (Proteínas secretórias ricas em cisteína) .....	7
2.1.1.2. Proteínas que contêm o domínio fibronectina tipo II (fn-II) (proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (fn-II)).....	10
2.1.1.3. Proteínas da família das espermedesinas .....	13
2.1.1.4. Outras proteínas presentes no plasma seminal .....	15
2.1.2. Composição bioquímica do plasma seminal .....	19
2.2. Efeito Sazonal Sobre Aspectos Seminais .....	25
2.3. Princípios da Criopreservação: .....	28
2. REFERÊNCIAS.....	32
3. CAPÍTULO 1 .....	48
ABSTRACT .....	49
INTRODUÇÃO .....	50
MATERIAIS E MÉTODOS .....	51
Delineamento Experimental .....	51
Instalações e Manejo dos Animais.....	52
Colheita de Sêmen: .....	53
Congelamento de Sêmen: .....	54
Descongelo do Sêmen:.....	54
Avaliação da funcionalidade da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico (HOST) .....	55
Teste Supravital .....	55
Determinação dos componentes Bioquímicos do Plasma Seminal: .....	56
Análise Estatística:.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS .....	70
4. CAPÍTULO 2 .....	76
RESUMO.....	76
ABSTRACT .....	77
INTRODUÇÃO .....	78
MATERIAIS E MÉTODOS .....	81
Delineamento Experimental .....	81
Instalações e Manejo dos Animais.....	81
Colheita de Sêmen: .....	82
Congelamento de Sêmen: .....	83
Descongelo do Sêmen:.....	84
Colheita e Processamento do Plasma Seminal: .....	84
Proteína Total do Plasma Seminal.....	84

Eletroforese Bidimensional .....	85
Coloração das Proteínas e Lavagem dos géis.....	87
Aquisição e Análise das Imagens .....	87
Identificação de Proteínas .....	87
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	89
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
CONCLUSÕES.....	102
ANEXO I .....	109
Solução de Equilíbrio .....	109
ANEXO II .....	109
Gel de poliacrilamida de 1,5 mm de espessura e 14 % T para a segunda dimensão da eletroforese bidimensional para uma amostra.....	109
ANEXO III .....	110
Gel bidimensional de poliacrilamida após separação eletroforética de proteínas do plasma seminal equino de doadores de sêmen classificados como de alta (esquerda) e baixa (direita) congelabilidade dos animais nomeados de A1 a A7. .....	110
ANEXO IV .....	113
Parecer de aprovação do Comitê de Ética .....	113

## RESUMO

BEZERRA, Luciana de Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Análise bioquímica e proteômica do plasma seminal equino e sua relação com a criopreservação do sêmen.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Maria Cristina Baracat-Pereira e Eduardo Paulino da Costa.

Este trabalho foi realizado com intuito de relacionar os constituintes bioquímicos e proteômicos do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador com a criopreservação. Em ambos os estudos foram utilizados garanhões hígidos da raça Mangalarga Marchador, com idades entre quatro e 15 anos e peso entre 400 e 500 kg. As colheitas foram realizadas no período de junho a agosto de 2013, totalizando 77 amostras. No experimento 1, após as colheitas foram retirados 3 mL de sêmen para análises bioquímicas de cálcio, colesterol, glicose, magnésio, fósforo, proteína total, potássio e sódio. Em sequência as amostras seminais foram diluídas na proporção 1:1 (sêmen/diluyente) e congeladas para realização dos testes de motilidade espermática total, vigor espermático, teste hiposmótico e teste supravital. Após o descongelamento, os ejaculados de cada animal foram separados em grupos de alta (> 40%) e baixa congelabilidade (< 40%). Não foram visualizadas diferenças nos parâmetros bioquímicos e seminais entre os animais ( $P > 0,05$ ), entretanto foram observadas diferenças na concentração de colesterol e glicose nos animais 1 e 3 ( $P < 0,05$ ), sendo a maior concentração no grupo de animais de baixa congelabilidade e correlação negativa entre o potássio e a motilidade espermática pós- descongelamento. Concluiu-se que os constituintes bioquímicos do plasma seminal não influenciam na congelabilidade seminal na raça Mangalarga Marchador. No experimento 2, após as análises físicas e morfológicas do sêmen, foram selecionados para o perfil proteômico, os plasmas seminais correspondente aos sêmen de maior e menor motilidade pós-descongelamento por animal. O perfil das proteínas foi avaliado pelo sistema SDS-PAGE e as proteínas identificadas por MALDI-TOF/ TOF, utilizando o software Mascot para a busca em banco de dados. O site do UniProt (SWISSPROT, NCBI, Equidae) foi consultado para identificação das proteínas e a validação dos resultados foi realizada pelo programa

SCAFOLD. As amostras não validadas pelo SCAFOLD foram analisadas pelo programa flexAnalysis (BRUKER®) para identificação de espectros de MS2 identificados pelo software Mascot. Foi observado diferença significativa em relação a CRISP 3 no grupo de sêmen de baixa congelabilidade e não foram observadas diferenças entre a HSP 1, a calicreína e a motilidade pós-descongelamento entre os grupos de sêmen de alta e baixa congelabilidade . Conclui-se que a CRISP3 com baixa massa molecular (22- 30 kDa) pode ser utilizada como biomarcador de baixa congelabilidade e que a calicreína e a HSP1 não podem ser utilizadas como marcadores de congelabilidade na raça Mangalarga Marchador.

## ABSTRACT

BEZERRA, Luciana Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Biochemical analysis and proteomics of equine seminal plasma and its relation to semen cryopreservation.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Maria Cristina Baracat-Pereira and Eduardo Paulino da Costa.

The aim of this study was evaluating biochemical and proteomic constituents of Marchador Mangalarga stallions seminal plasma by cryopreservation. Both studies were carried out on healthy Marchador Mangalarga stallions, ageing from four to 15 years old and weighting between 400 and 500 kg. The samples were collected from June to August 2013, totalizing 77 samples. In experiment 1 after collection, 3 ml total semen were taken for calcium cholesterol, glucose, magnesium, phosphorus, total protein, sodium and potassium biochemical analyses. Subsequently, semen samples were diluted on 1: 1 (semen / diluent) and frozen in order to perform motility, sperm vigor, hyposmotic and supravital tests. After thawing, the ejaculate from each animal was divided into high (>40%) and poor (<40%) freezability groups. No differences on biochemical and seminal parameters among animals ( $P>0.05$ ) were reported but differences on cholesterol and glucose concentrations in animals 1 and 3 ( $P<0.05$ ) were observed. Animals from the low freezability group showed higher concentration and negative correlation between potassium and sperm motility after freezing. It might be concluded that seminal plasma biochemical constituents did not affect Mangalarga Marchador seminal freezability. In experiment 2, after physical and morphological semen analyses, seminal plasma corresponding to higher and lower semen post freezing motility per animal were selected for the proteomic profile. Protein profile was assessed by SDS-PAGE system and proteins identified by MALDI-TOF / TOF using the Mascot software searching the database. The site UniProt (SWISSPROT, NCBI, Equidae) was checked out identifying proteins and validation results by scaffold program were performed. No validated samples by scaffold by flexAnalysis program (BRUKER®) were analyzed verifying the MS2 spectra identified by Mascot software. Significant difference in regarding to the CRISP 3 in lower freezability group was observed and no difference to the HSP 1 between high and low semen freezability groups, kallikrein and post-thaw motility was observed. It might be concluded

that the CRISP3 low molecular weight (22- 30 kDa) might be used as biomarker low freezability biomarker, as well as, kallikrein and the HSP1 might not be used as markers on freezability tests Mangalarga Marchador.

## INTRODUÇÃO

Diversos progressos foram alcançados nos últimos anos no processo de criopreservação do sêmen equino, porém a eficiência desta tecnologia varia com a qualidade do sêmen pós-descongelamento, entre os animais e até mesmo entre diferentes colheitas de sêmen do mesmo animal. Esses fatores em geral limitam a difusão da criopreservação como rotina na equideocultura.

Na última década, Associações de raças permitiram empregar sêmen congelado em programas de inseminação artificial, o que estimulou pesquisas empregando-se diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões. Entretanto, estima-se que apenas 30 a 40% dos garanhões produzam sêmen adequado à criopreservação (ALVARENGA et al., 2005). Em algumas raças, como a Mangalarga Marchador, a proporção de animais com sêmen de baixa congelabilidade é maior do que em outras raças. Segundo os autores muitos fatores podem interferir na qualidade e resistência à criopreservação do sêmen de garanhões, destacando-se principalmente os fatores genéticos e os relacionados à composição da membrana plasmática espermática do espermatozoide e do plasma seminal. Algumas raças apresentam maior susceptibilidade às lesões espermáticas decorrentes dos processos de criopreservação (ALVARENGA et al., 2014).

Fatores diversos no plasma seminal influenciam a motilidade espermática (JASKO et al., 1991), podendo levar a alterações na viabilidade espermática e na capacidade de fertilização dos animais (VARNER et al., 1987). O plasma seminal, considerado o veículo do ejaculado, contém componentes que são fundamentais à sobrevivência espermática e substratos metabolizáveis pelos espermatozoides como cálcio, glicose e zinco

(BRANDON et al., 1999), sendo a sua completa remoção contra indicada em geral (PICKETT et al. 1975). Entretanto em equinos, a remoção do plasma seminal é uma prática realizada rotineiramente no processo de criopreservação, pois se acredita que a presença do plasma seminal promova efeito deletério sobre a preservação das células espermáticas, e também com o objetivo de aumentar a concentração por dose (embalagem) e permitir assim a adição de maior quantidade de diluente protetor (ALBERTI et al., 2005).

As interações dos componentes do plasma seminal e das proteínas de membrana dos espermatozoides podem ser responsáveis pelas diferenças na fertilidade e na congelabilidade do sêmen, em resposta a variações na composição proteica (RONCOLETTA et al., 2004). A diferenciação, identificação e quantificação de componentes do plasma seminal que estejam relacionados à estabilização ou proteção da membrana dos espermatozoides são de extrema importância para a criopreservação, visto que, a integridade da mesma é fundamental para o funcionamento adequado do gameta masculino.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a presença de componentes bioquímicos, proteicos e não proteicos do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador, e correlacioná-los com a viabilidade espermática após o processo de criopreservação.

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Plasma Seminal

Nos equinos, o plasma seminal é composto pelas secreções dos epidídimos, das ampolas dos ductos deferentes, das vesículas seminais, da próstata, e das glândulas bulbo-uretrais. A secreção dos órgãos genitais do garanhão é comumente dividida em três frações. A primeira porção ejaculada é uma fração pré-espermática, aquosa, sem espermatozoides, glicerilfosforilcolina (GPC), ergotineína ou ácido cítrico (AMANN; GRAHAM, 1993), porém é rica em cloreto de sódio e tem por função a limpeza da uretra (KELLER et al., 2001), sua produção é de origem prostática e das glândulas bulbouretrais (AMANN; GRAHAM, 1993). A segunda fração é liberada poucos segundos após e tem aspecto leitoso, é rica em espermatozoides, GPC e ergotineína, conteúdo pouco ácido cítrico ou gel. Esta fração contém secreções dos epidídimos e das ampolas dos ductos deferentes. A terceira fração contém poucos espermatozoides ou ergotineína, mas grandes quantidades de gel e ácido cítrico. Este fluido é produzido nas vesículas seminais e tem por função remover os poucos espermatozoides que permaneceram na uretra no momento da ejaculação (AMANN; GRAHAM, 1993).

A glicerilfosforilcolina, produzida nos epidídimos, tem importante papel no metabolismo dos lipídios (MANN, 1964) e na maturação dos espermatozoides (MAGESTRINI et al., 1995) podendo ser utilizada como marcador da função secretória dos epidídimos (KLUG, 1982). A ergotineína, produzida nas ampolas dos ductos deferentes, tem a função de proteger os espermatozoides contra agentes oxidantes e peroxidantes (MANN, 1975).

O plasma seminal exerce várias funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação em equinos, como ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, proteção contra a acrosina por meio de inibidores de proteases, dentre outros. Além disso, é mediador da capacitação espermática e da resposta inflamatória pós-coital no útero de éguas (TROEDSSON et al., 2005).

No plasma seminal, fatores estimuladores da motilidade espermática podem ser divididos em dois grandes grupos: i) fatores de ativação catalítica, como íons, nucleotídeos e ativadores específicos, provavelmente de origem proteica, encontrados nas diferentes glândulas acessórias, principalmente na próstata; ii) nutrientes que fornecem a energia metabólica exigida para a motilidade e a sobrevivência dos espermatozoides (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). O plasma seminal possui ainda substâncias enzimáticas e não-enzimáticas que atuam como defesa contra espécies reativas ao oxigênio (ROS). Além dessas enzimas, o plasma seminal apresenta outros componentes que atuam como antioxidantes, entre eles, a vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (ALMEIDA; BALL, 2005).

Apesar de sua reconhecida importância, todos os protocolos de criopreservação e resfriamento de sêmen de garanhões preconizam a retirada do plasma seminal, substituindo-o por diluentes, podendo reduzir a proteção natural conferida aos espermatozoides pelo plasma seminal. Amann e Pickett (1987) relataram que a sua remoção é necessária para a sobrevivência dos espermatozoides criopreservados. Watson (1995) relatou que a criopreservação induz a alterações na membrana plasmática, que fazem os espermatozoides se comportarem como se estivessem parcialmente

capacitados. Esta capacitação prematura pode ser resultado da perda de lipídios durante o congelamento e o descongelamento (WATSON, 1995), e/ou da perda de fatores decapacitantes presentes no plasma seminal e que são removidos após a centrifugação. Quando os espermatozoides (tanto capacitados como não capacitados) são expostos ao plasma seminal, eles ficam incapacitados de sofrer reação acrossômica precoce e completar a fertilização (MORTIMER et al., 1998).

A remoção do plasma seminal é uma técnica utilizada rotineiramente na criopreservação de sêmen de equinos, sendo essencial e necessária para o sucesso do congelamento. Em carneiros e bovinos, sua remoção também mostrou melhorar significativamente os parâmetros do sêmen descongelado (ALBERTI et al., 2005). Alguns estudos em equinos indicaram que altas concentrações de plasma seminal podem ter efeitos deletérios sobre a motilidade espermática, após armazenamento por períodos prolongados (MAGESTRINI et al., 1995). Por outro lado, muitos estudos apontam que o plasma seminal contém grande número de proteínas e glicoproteínas que, participam de interações específicas, promovem a remodelação da superfície do espermatozoide ao longo do órgão genital masculino durante a maturação pós-testicular. Acredita-se que as mesmas estão envolvidas na manutenção do reservatório espermático no oviduto (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005b), no controle da capacitação espermática (fatores decapacitantes e/ou estimulando a capacitação) (MANJUNATH; THERIEN, 2002) e em eventos de fertilização: na interação espermatozoide-zona pelúcida e na fusão dos espermatozoides com o oócito (TÖPFER-PETERSEN, 1999 a,b) porém, pouco

se sabe ainda quanto aos efeitos destes componentes sobre a função e a congelabilidade dos espermatozoides.

### **2.1.1. Composição proteica do plasma seminal**

As proteínas e os peptídios são macromoléculas presentes também no plasma seminal. Dentre outras funções, as proteínas estão envolvidas no processo de remodelação da membrana espermática, que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação (DACHEUX et al.,2003). As secreções de proteínas nos epidídimos são altamente regionalizadas, sendo a cabeça e o corpo as regiões mais ativas. Na espécie equina, cerca de 73% dos compostos proteicos são secretados nas cabeças dos epidídimos (GATTI et al., 2004). As proteínas epididimárias adquiridas pela membrana espermática durante o trânsito epididimário são classificadas de acordo com o tipo de interação com as células espermáticas. Podem ocorrer ligações fracas, responsáveis pela quiescência dos espermatozoides, ou ligações fortes, importantes nos órgãos genitais da fêmea e na fertilização; ou modificações das proteínas da membrana plasmática, encobrendo ou expondo receptores; ou até mesmo a presença de proteínas livres no fluido epididimário, colaborando com a manutenção do meio (MARENGO, 2008).

A concentração de proteínas do plasma seminal equino é relativamente baixa (10 mg/mL) quando comparada a outros mamíferos (20-60 mg/mL). As proteínas do plasma seminal equino (*horse seminal plasma proteins*, HSP), descritas como HSP-1 a HSP-8, apresentam de 14 a 30 kDa e são as principais proteínas até então isoladas e identificadas no plasma seminal de garanhões. Com exceção da HSP-4, todas apresentam propriedades de

ligação aos espermatozoides durante a ejaculação e podem ser isoladas nos espermatozoides do ejaculado (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Nos anos seguintes, essas proteínas foram subdivididas em três grupos: as proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs), proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2) e proteínas da família das Espermedesinas (KARESKOSKI; KATILA, 2008) (Tabela 1).

#### **2.1.1.1. Proteínas ricas em cisteína (CRISPs) (Proteínas secretórias ricas em cisteína)**

Os membros da família de proteínas ricas em cisteína (CRISP1, CRISP2, CRISP3) apresentam 16 resíduos de cisteína ligados por ligações dissulfeto, subdividindo a molécula em três domínios (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). As três proteínas CRISPs foram identificadas nos órgãos genitais de equinos, humanos e roedores, sendo sua expressão gênica controlada por fatores androgênicos (JALKANEN et al., 2005). A ocorrência desse grupo proteico, porém, não se restringe apenas aos órgãos genitais masculinos, podendo este ser encontrado em glândulas salivares, neutrófilos, linfócitos B, timo, cólon e pâncreas (SCHAMBONY et al., 1998b; TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Em roedores, CRISP2 (também conhecida como TPX1) e CRISP1 (AEG1, *acidic epididymal glycoprotein 1*) são expressas nos testículos e epidídimos, respectivamente, enquanto CRISP3 (AEG2, *acidic epididymal glycoprotein 2*) foi primeiramente identificada nas glândulas salivares dos roedores. Um membro adicional da família das proteínas ricas em cisteínas foi

descrita como CRISP4 encontradas nos ductos epididimários em camundongos (JALKANEN et al., 2005).

A participação das CRISPs no processo de fertilização foi amplamente estudada nos roedores. A CRISP1, inicialmente descrita como proteína-DE encontrada nos epidídimos de roedores (CAMEO; BLAQUIER, 1976), apresenta 227 resíduos andrógeno-dependentes, encontra-se fortemente aderida à superfície espermática durante o trânsito epididimário e migra para o segmento equatorial durante a capacitação (DA ROS et al., 2004). Ela participa diretamente da fusão dos espermatozoides-oócito por meio da interação dos sítios de ligação da proteína a sítios de interação complementares na superfície do oócito (ELLERMAN et al., 2002), entretanto, não participa nos eventos da ativação do oócito (BUSSO et al., 2003). Estudos avaliando a estrutura funcional desta proteína demonstram que o seu funcionamento está associado à integridade das ligações dissulfeto (ELLERMAN et al., 2002).

As proteínas CRISPs nos espermatozoides de equinos localizam-se na cabeça, em sua região equatorial e pós-acrossomal, bem como na peça intermediária. Sua associação com a superfície espermática tem início na região do corpo dos epidídimos (SCHAMBONY et al., 1998b) e permanecem localizadas nas mesmas regiões espermáticas após a capacitação *in vitro* e a reação acrossômica (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). As proteínas CRISPs (especialmente a CRISP3) podem ser removidas da célula espermática por lavagem com altas concentrações de sal, entretanto, algumas moléculas da CRISP permanecem fortemente ligadas à superfície espermática (SCHAMBONY et al., 1998b). A quantificação das CRISPs por Elisa competitivo demonstrou que valores acima de 18.000 moléculas/ célula

espermática apresentam correlação com alta taxa de fertilidade (REINEKE et al., 1999).

A CRISP3 (HSP-3, horse seminal protein 3) é a principal proteína do plasma seminal equino (SCHAMBONY et al., 1998a). Sua ocorrência não se restringe apenas aos órgãos genitais masculinos e seu gene é predominantemente expresso nas ampolas dos ductos deferentes (e nas glândulas salivares), contribuindo assim, para a alta concentração desta proteína (1mg/mL) no plasma seminal desta espécie. Quantidades superiores de CRISP3 foram positivamente relacionadas com a taxa de concepção no primeiro ciclo por Novak et al. (2010) e poderia ser considerado um bom marcador de fertilidade em equinos. Trein (2011) sugere importante papel da CRISP3 e HSP2 no processo de criopreservação como possíveis marcadores de congelabilidade. Esta proteína apresenta a particularidade de liberação da membrana plasmática (ao menos parcialmente) por meio de lavado das células espermáticas, e por isto foi proposto que poderia possuir alguma função nos órgãos genitais da fêmea (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Para Doty et al. (2011) esta proteína participa do mecanismo de limpeza uterina. Segundo Magdaleno et al. (1997), a CRISP3 é constituída de um polipeptídeo não glicosilado de 24.987 Da com valor de ponto isoelétrico (pI) teórico de 8-9. A concentração de CRISP3 em diferentes ganhões pode atingir de 0,3 a 1,3 mg/mL de plasma seminal. A presença desta proteína na região pós-acrossomal e na porção média da cabeça dos espermatozoides ejaculados sugere papel importante na fisiologia espermática.

O gene da CRISP1 equina (AEG1) é expresso ao longo de todo o epidídimo (GIESE et al., 2002a), enquanto que a CRISP2 (TPX1), proteína

específica do testículo, apresenta-se expressa não só no testículo de equinos como também nos epidídimos e nas glândulas seminais de garanhões (GIESE et al., 2002b). Segundo Maeda et al. (1999), a CRISP2 (TPX1) está envolvida no desenvolvimento das espermátides, sendo esta proteína uma das responsáveis pela aderência destas células as células de Sertoli, que são células somáticas de grandes dimensões do interior dos testículos, relacionadas com diversas células germinativas no túbulo seminífero.

O padrão de expressão do gene da CRISP foi acompanhado pelo estudo da abundância proteica, quando estas proteínas foram detectadas com diferentes massas moleculares (em torno de 25 kDa) nos órgãos genitais dos equinos (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Foi sugerido que as proteínas CRISP1 e/ou CRISP2 podem influenciar diretamente os eventos da fertilização (fusão espermatozoides–oócito), e CRISP-3, além de participar dos estágios finais da fusão dos espermatozoides-oócito (identificada na região pós acrossomal e equatorial), pode ter participação na proteção das células espermáticas (SCHAMBONY et al., 1998).

#### **2.1.1.2. Proteínas que contêm o domínio fibronectina tipo II (fn-II) (proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (fn-II)).**

Proteínas da família que contêm o domínio fibronectina tipo II (Fn-II) são caracterizadas pela presença de dois módulos fibronectina tipo II (Fn-II), que são denominados domínios 'BB'. Essas proteínas são expressas em diferentes regiões dos órgãos genitais masculinos, sendo expressas no corpo e cauda dos epidídimos (EQ-12) e nas ampolas dos ductos deferentes (SP-1/SP-2)

(EKHALASI- HUNDRIESER et al., 2005a) e identificadas em várias espécies de animais, sendo mais abundantes em bovinos (BSP; MANJUNATH; SAIRAM, 1987), caprino (VILLEMURE et al., 2003), ovino (RSP; BERGERON et al., 2005) e em equino (HSP-1, HSP-2; CALVETE et al., 1995a,b; MENARD et al., 2003). Também foi descrita no plasma seminal do suíno, onde se encontra em menor concentração – pB1 (CALVETE et al., 1997a). Mais recentemente, foi identificado um grupo de proteínas fibronectina Fn-II, formadas por quatro módulos, originárias dos epidídimos e que podem estar relacionadas com a maturação espermática. No equino, esta proteína foi denominada EQ-12 (SAALMAN et al., 2001). Há uma década, HSP-1 e HSP-2 foram denominadas SP-1 e SP-2 (EKHALASI- HUNDRIESER et al., 2005a).

A caracterização estrutural da HSP-1 equina mostrou que ela é uma proteína que contém o domínio fibronectina tipo II e pertence ao tipo 'AABB' caracterizado por dois módulos (BB) e por dois pequenos domínios "AA". HSP-2 corresponde ao tipo 'ABB', somente com um domínio "A". HSP-1 e HSP-2 são sintetizadas nas ampolas dos ductos deferentes (EKHALASI- HUNDRIESER et al., 2005a). Tanto a EQ-12 como a SP-1 e a SP-2 são associadas à superfície espermática durante o trânsito epididimário e na ejaculação, e ambas estão presentes nos espermatozoides do ejaculado. A abundância de SP-1 foi negativamente relacionada à fertilidade em equinos por Novak et al. (2010) e Jobim et al. 2011 e Garcia (2014) associaram a presença de HSP1 em animais de baixa congelabilidade.

SP-1 e SP-2 são as proteínas mais abundantes no plasma seminal equino, correspondendo a 70–80% do total de proteínas e são as ortólogas equinas das principais proteínas com propriedade de ligação à heparina do

plasma seminal bovino (BSP), que estão envolvidas na capacitação espermática (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Na ejaculação as proteínas que contêm o domínio fibronectina tipo II se unem aos espermatozoides mediante interações específicas com os resíduos de colina dos fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides (MÜLLER et al., 1998), mediando a capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolipídios (THÉRIEN et al., 1999). Além da ligação aos espermatozoides, estas proteínas unem-se também a glicosaminoglicanos dos órgãos genitais femininos (MANJUNATH et al., 1993a). Estas proteínas apresentam a capacidade de ligação à heparina, que é um polissacarídeo que se liga aos espermatozoides bovinos pelas proteínas e é capaz de induzir a capacitação (MILLER et al., 1990). Tal efeito é obtido pela modulação na atividade da proteína à qual ela se liga. Glicosaminoglicanos semelhantes à heparina são secretados, particularmente na fase folicular, pelos órgãos reprodutivos da fêmea, o que estimula a capacitação (LENZ et al., 1982). Além disso, essas proteínas de ligação à heparina são produzidas pelas glândulas acessórias (NASS et al., 1990) e cobrem a superfície dos espermatozoides do ejaculado (MILLER et al., 1990).

As proteínas de ligação à heparina de bovinos são amplamente estudadas.

Avaliando a ligação das proteínas BSP, Manjunath et al. (1993b) verificaram que a BSP A1/A2 e a BSP 30 kDa exibiram alta atividade quando ligadas à calmodulina, o que pode influenciar positivamente no transporte intracelular do  $Ca^{2+}$  e na reação acrossomal. Desta forma, as proteínas BSP

estariam envolvidas com a capacitação espermática e com a reação acrossomal e, conseqüentemente, com os fenômenos de fertilização.

As proteínas BSP modulam a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> e, com isso, regulam o metabolismo dos fosfolipídios da membrana espermática (MANJUNATH et al., 1994). Os sítios de ligação dos colina-fosfolipídios na membrana espermática são substratos para a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), uma enzima-chave na capacitação (SOUBEYRAND et al., 1998). Posteriormente, foi comprovado que as BSPs promovem a capacitação espermática pela remoção do colesterol da membrana plasmática (THÉRIEN et al., 1999). Quando isso ocorre, a relação colesterol/fosfolipídio diminui, acontece o influxo de cálcio e o pH intracelular aumenta. Acredita-se que estes eventos sejam essenciais para que ocorra a reação acrossomal (THÉRIEN et al., 1999). Estas proteínas também podem modular os efeitos de outros agentes capacitantes, como são a progesterona e a angiotensina-II (FIOL DE CUNEO et al., 2004).

#### **2.1.1.3. Proteínas da família das espermedesinas**

As espermedesinas são glicoproteínas de baixa massa molecular (12-16 kDa), compostas por 110 a 133 resíduos de aminoácidos, constituídas estruturalmente por um único domínio “CUB” que é estabilizado por duas ligações dissulfeto conservadas, com resíduos de cisteína ao redor. Esse domínio atua como suporte estrutural, e ao qual se pode atribuir diferentes funcionalidades (ROMERO et al., 1997). Nos suínos foram identificados cinco genes estreitamente relacionados que codificam as espermedesinas (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I e PSP-II) (CALVETE et al., 1995b), e apenas dois genes estão presentes para codificar as espermedesinas bovinas, aSFP (SPADH1) e

Z13 (SPADH2) (TEDESCHI et al., 2000). No ovino, uma espermedesina de 15,5 kDa foi descrita (BERGERON et al., 2005), e no equino, a HSP-7 (REINERT et al., 1996). Cópias inativas de genes desta família foram detectadas em seres humanos, chimpanzés e cães, enquanto que em roedores não foram identificadas regiões correspondentes (HAASE et al., 2005). Embora um membro da família espermedesina (AWN) tenha sido identificado no plasma seminal equino, o gene correspondente ainda é desconhecido na espécie (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Na espécie suína, as espermedesinas correspondem ao principal componente proteico do plasma seminal, representando mais de 90% das proteínas. Produzidas pela glandulas seminais, são consideradas proteínas multifuncionais que exibem capacidade de ligação à heparina, a inibidores de proteinases, aos fosfolípidos e aos carboidratos (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998; 1999a,b). As principais espermedesinas suínas, PSP-I / PSP-II, diferentemente das outras proteínas, não apresentam propriedade de ligação aos espermatozoides e à heparina, porém exibem propriedades para modular a resposta imune (ASSREUY et al., 2002) no oviduto (EKHLASI-HUNDRIESER et al, 2005b). As espermedesinas AWN, AQN-1 e AQN-3 do suíno são proteínas de ligação à superfície espermática e parecem estar envolvidas nos eventos mediados por carboidratos que ocorrem na fertilização (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005a). Curiosamente, AWN é secretada nas caudas dos epidídimos e é igualmente expressa nas tubas uterinas (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002). Segundo Rodrigues-Martinez et al. (1998), a proteína AWN permanece aderida à membrana periacrossomal após o

transporte pelo órgão genital feminino; na capacitação espermática, e acredita-se que a mesma possa estar envolvida no reconhecimento de gametas.

HSP-7 é a espermedesina equina homóloga à AWN suína. Sua sequência aminoacídica apresentou modificações de resíduos de aminoácidos em apenas três posições (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2002). Como é homóloga à AWN suína, é uma proteína de ligação a carboidratos. Mostrou propriedades de ligação à zona pelúcida equina, demonstrando seu papel na interação espermatozoides-zona pelúcida. Em contraste com a AWN suína, a HSP-7 foi primeiramente detectada na espermatogônia, depois na rete testis, nos epidídimos e nas glândulas seminais. Também foi isolada de alguns espermatozoides testiculares (HOSHIBA; SINOWATZ, 1998). Durante a passagem pelos epidídimos, acontece um aumento da HSP-7 associada aos espermatozoides, aparecendo como uma banda proeminente no segmento equatorial (REINERT et al., 1997).

#### **2.1.1.4. Outras proteínas presentes no plasma seminal**

Existem outras proteínas presentes no plasma seminal equino que contribuem para aumentar a variabilidade funcional de proteínas do plasma seminal. A HSP-4 é uma proteína que está relacionada ao produto semelhante ao gene da calcitonina, e concentrações aumentadas de calcitonina no plasma seminal foram relacionados à melhora na motilidade espermática (MUNGAN et al., 2001), à prevenção da capacitação prematura e à reação acrossômica espontânea pelo sistema adenilciclase/AMPC (FRASER et al., 2005).

A HSP-5 apresenta propriedade de ligação à heparina, porém ainda não foi relacionada a nenhuma proteína conhecida. Sua funcionalidade e sequência

do N-terminal não foram identificadas em proteínas de outras espécies (TÖPPFER-PETERSEN et al., 2005).

HSP-6 e HSP-8 são diferentes isoformas de uma mesma proteína que pertence à família das calicreínas (TÖPPFER-PETERSEN et al., 2005). Em garanhões, quantidades maiores de calicreína 1E2 (KLK2) foram relacionadas negativamente com a fertilidade (NOVAK et al, 2010). As sequências do N-terminal de ambas isoformas mostraram alto grau de homologia com o antígeno prostático humano (PSA). O rompimento da arquitetura prostática normal seja pelo câncer, Hiperplasia Prostática Benigna (BPH, do inglês Benign Prostate Hiperplasia) ou dano ligado à glândula (inflamação ou trauma) pode desencadear um aumento nas concentrações séricas de PSA no homem. Desta forma, o PSA atua como biomarcador mais utilizado para o rastreamento de câncer de próstata no mundo, tendo sua dosagem sérica total (tPSA) amplamente solicitada por urologistas para fins de diagnóstico desde sua descoberta na década de 80, devido a sua alta sensibilidade, fácil dosagem, disponibilidade e baixo custo (NA et al., 2013).

Em 2014 no Brasil, mais de 4,8 milhões de testes foram autorizados pelo SUS, totalizando aproximadamente R\$ 79 milhões em exames (DATASUS, 2015). Embora seu constante uso, o PSA é um marcador órgão-específico e não câncer-específico, justificando, assim, o fato de não ser o método confirmatório no diagnóstico de câncer de próstata (NA et al., 2013). Mesmo que muitos estudos e debates de especialistas acerca das concentrações normais de PSA tenham sido realizados, ainda não existe consenso quanto ao limiar seguro que consiga distinguir homens com alto ou baixo risco de serem diagnosticados ou desenvolver câncer no futuro. Tampouco é possível medir a

gravidade desta neoplasia, embora concentrações muito elevadas de PSA tenham correlação com maior gravidade nos casos de câncer de próstata (THOMPSON JR et al. 2011).

Tradicionalmente, a faixa de 4 a 10 ng/mL de PSA é considerada como risco e os pacientes são suspeitos para câncer de próstata. Por esta razão, o valor de 4 ng/mL é comumente aceito como *cut-off* por muitos urologistas (INGLE, et al, 2013; NA et al, 2013).

Por ser uma serina protease ativa, componente do plasma seminal, sua função é liquefazer o coágulo seminal que se forma na ejaculação liberando os espermatozoides (JONSSON et al., 2005). O sistema enzimático das calicreína-cininas do plasma seminal são capazes de modular a motilidade dos espermatozoides, pelo cininogênio presente no plasma seminal que atua como substrato específico da enzima calicreína (FINK et al., 1989) produzindo as cininas, que são os principais efetores no estímulo da motilidade espermática após a ejaculação (SCHILL et al., 1989). Foram observadas correlações positivas entre a atividade da calicreína no plasma seminal e a motilidade dos espermatozoides no ejaculado (SOMLEV et al., 1996). Um grupo de proteínas que constituem componentes de importância secundária no plasma seminal equino foi descrito. Dentre essas proteínas, encontra-se a lactoferrina (INAGAKI et al., 2002), que pode ter origem nos testículos, como foi demonstrado no cão (KIKUCHI et al., 2003). Há também a leptina e os fatores de crescimento, que podem promover a longevidade dos espermatozoides (CHAMPION et al., 2002), e várias enzimas, tais como lipases (CARVER; BALL, 2002),  $\alpha$  1,4-glicosidases (DIAS et al., 2004) e uma enzima conversora da angiotensina (BALL et al., 2003).

**Tabela1.** Proteínas do plasma seminal em diferentes espécies de animais

<b>Família ou</b>	<b>Espécie</b>	<b>Proteína</b>	<b>Referência</b>	
<b>Classe Proteica</b>				
<b>CRISPs</b>	Humano	CRISP1,CRISP2,	Udby et al. (2005)	
		CRISP3	Koppers et al. (2011)	
			Caballero et al. (2012)	
	Equino	CRISP1,	Schambony et al. (1998b)	
		CRISP2, CRISP3	Töpfer-Petersen et al. (2005)	
		(HSP3)	Jobim et al. (2011)	
	Rato	CRISP1	Da Ros et al.(2004)	
			Koppers et al. (2011)	
	<b>Proteínas com domínio fibronectina tipo II (Fn-II).</b>	Equino	HSP-1, HSP-2,	Calvete et al. (1995a)
			EQ-12	Töpfer-Petersen et al. (2005)
			Saalman et al. (2001)	
			Garcia et al. (2014)	
Bovino		BSP-A1/A2,	Manjunath; Sairam (1987)	
		(PDC-109),	Manjunath; Therien (2002)	
		BSP-30k Da	Canio et al. (2014)	
Ovino		RSVP-14,	Barrios et al. (2005)	
		RSVP-20, RSP-	Bergeron et al. (2005)	
		15, RSP-22,	Cavalcante et al. (2013)	
	RSP-24			
Caprino	GSP-14, GSP-	Villemure et al. (2003)		
	15, GSP-20,	Druart et al. (2013)		

		GSP-22 kDa	
	Suíno	pB1	Calvete et al., 1997 González-Cadavid et al. (2014)
<b>Espermadesinas</b>	Equino	HSP-7	Reinert et al. (1996) Trein, (2011)
	Bovino	aSFP, Z13	Wempe et al. (1992) Tedeschi et al. (2000) Bustamante-Filho et al. (2014)
	Ovino	Espermadesina de 15,5 kDa	Bergeron et al. (2005)
	Suíno	AWN, AQN-1, AQN-3, PSPI/PSP-II	Calvete et al. (1995c) Varela et al. (1997) Calvete and Sanz. (2007) Caballero et al. (2008) González-Cadavid et al. (2014)

---

### 2.1.2. Composição bioquímica do plasma seminal

Avaliando-se o efeito do plasma seminal sobre os espermatozoides, foram demonstrados que sob certas condições, determinados constituintes seminais promovem aumento da resistência celular ao choque térmico, pois estabilizam a membrana espermática (AURICH et al., 1996) e contribuem para a manutenção da sobrevivência espermática (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). Porém, a grande diversidade de proteínas, lipídios e hormônios no plasma

seminal sugere que importantes funções fisiológicas deste fluido e a sua interação com as células espermáticas ainda são desconhecidas. Esta idéia pode ser aceita pelo fato de que alguns componentes, característicos do plasma seminal de algumas espécies (como a frutose e o zinco em altas concentrações) não estão presentes em outros fluidos corporais (ARIENTI et al., 1999).

As quantidades de eletrólitos e oligoelementos presentes no plasma seminal de garanhões variam individualmente entre animais de mesma raça, animais de raças diferentes e ainda nas diferentes frações do ejaculado. Sódio, potássio, cálcio e magnésio são considerados os principais cátions e o cloreto os principais íons (WITE, 1988). A função espermática é altamente dependente do ambiente iônico. Alguns dos constituintes seminais têm origem em órgãos específicos, e a mensuração de suas concentrações é importante para avaliar a capacidade secretora de várias glândulas sexuais acessórias, capacidade esta, dependente da produção de andrógenos pelos testículos (MANN, 1974). Alterações nas concentrações de componentes do plasma seminal podem gerar alterações metabólicas, comprometimento da motilidade total (SKANDHAN, 1981) e infertilidade (CAMPOS et al., 2000). Em humanos, a infertilidade tem sido associada a concentrações anormais de Ca, Mg e Zn no plasma seminal (BARRIER-BATTUT et al., 2002). Em garanhões, as concentrações de Ca, Mg e fosfato inorgânico são maiores nas frações do ejaculado produzido nos epidídimos e nas ampolas dos ductos deferentes (KARESKOSKI et al., 2005).

O fósforo é importante no metabolismo celular, em especial pela sua participação direta nos mecanismos bioquímicos ligados ao metabolismo

energético. Além disso, este íon está ligado à ativação e à inativação de enzimas, via quinases e fosfatases, importante tanto no metabolismo quanto na sinalização celular. No organismo animal, o fósforo é largamente encontrado na forma inorgânica como ortofosfato ou pirofosfato. Na sua forma orgânica, constitui importante componente de fosfoproteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, bem como de uma variedade de intermediários metabólicos (SMITH et al., 1985). No sêmen, este íon apresenta maiores concentrações no plasma seminal do que dentro dos espermatozoides (ABDEL-RAHMAN et al., 2000). Entretanto, estas concentrações podem variar entre as espécies. Dhami e Shani (1993) verificaram que as concentrações de fosfato inorgânico, fosfato ácido e ésteres de fosfato no plasma seminal de bovinos são significativamente mais baixas do que as observadas em bubalinos.

O cálcio é um elemento essencial, importante regulador da fisiologia espermática, que se apresenta em concentrações maiores no plasma seminal do que no sangue, com origem especialmente prostática, epididimária e, em menor parte, das glândulas seminais. Este cátion está envolvido em várias etapas da maturação espermática, na motilidade e nos processos de capacitação e reação do acrossoma (SOUZA, 1999). O cálcio é o desencadeador da reação do acrossoma em espermatozoides de mamíferos. Diversas evidências mostram que ele está envolvido de forma diferenciada na motilidade, dependendo do estágio de maturação espermática (WONG et al., 2001). Sugere-se que, num primeiro momento, o cálcio promova alteração na curvatura flagelar, levando à hiperativação da motilidade e, em um segundo momento, seja antagonista do AMPc, diminuindo gradualmente a motilidade (LINDEMANN; KANOUS, 1989).

Apesar de haver diversos estudos sobre as funções do cálcio, pesquisas acerca da relação entre o cálcio e os parâmetros seminais são controversas. Apesar de Abdel-Rahman et al. (2000) terem observado que altas concentrações de cálcio seminal promoveram redução na atividade dos espermatozoides, Wong et al. (2001) não constataram nenhuma associação benéfica ou adversa entre o cálcio e a motilidade espermática. Em relação ao efeito do cálcio na capacitação espermática, Visconti e Kopf (1998) sugeriram que esse cátion bivalente desempenha importante papel neste processo, devido à sua ação como efetor enzimático, envolvido na transdução de sinal na célula espermática via adenilciclase e fosfodiesterase.

As concentrações de Ca total e ionizada são positivamente correlacionadas com o volume do ejaculado, atribuindo às glândulas sexuais acessórias a função de principais produtoras de Ca no plasma seminal, sendo que aproximadamente 60 a 75% do Ca total do plasma seminal do garanhão é ionizado, o que não é observado em humanos (PESCH et al., 2006)

O magnésio é um importante cátion observado em quase todos os sistemas enzimáticos, promove modificações em substratos enzimáticos específicos e desempenha papel fundamental como cofator em mais de 300 reações enzimáticas envolvendo o metabolismo energético (ATP) e a síntese de ácidos nucléicos. Acredita-se que ele possa ter um papel na espermatogênese, particularmente na motilidade espermática, pela indução da atividade da adenilciclase (LAPOINTE et al., 1996). Apesar de o magnésio ser encontrado em altas concentrações no sêmen, o seu papel na qualidade espermática ainda não foi completamente elucidado. Importantes alterações na concentração de magnésio parecem estar relacionadas com a função anormal

dos espermatozoides e a sua capacidade fertilizante, entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações destes cátions no sêmen de homens normospérmicos, oligospérmicos ou azoospérmicos (ADJUWON et al., 1996). Sabe-se ainda, que o magnésio é considerado um marcador da secreção das glândulas seminais e que ele age como antagonista intracelular do cálcio (WONG et al., 2001).

Diferente do de outras espécies, o sêmen equino possui maior concentração de glicose que frutose (0,82 e 0,02 mg/mL, respectivamente) em contraste ao sêmen de touros e carneiros, em que a frutose é o principal açúcar (AMANN; GRAHAM, 1993). A concentração de glicose no sêmen de garanhões pode ser o dobro da frutose, sendo a glicose a principal responsável pelo fornecimento de substrato para sobrevivência da célula espermática (BARONOS, 1971).

Apesar de haver uma série de diluidores comerciais que contenham substrato para a sobrevivência dos espermatozoides, Engle et al. (1975) demonstraram que o sêmen de garanhões com maior concentração de glicose endógena apresentava maior durabilidade quando submetido a ambientes anaeróbicos, semelhante ao ambiente uterino. A movimentação dos espermatozoides necessita de energia. Como as células espermáticas possuem as enzimas necessárias para executar as reações bioquímicas da glicólise, sua concentração no sêmen torna-se limitante para a durabilidade dos gametas masculinos (GARNER; HAFEZ, 1995).

Em muitas espécies, o colesterol é o principal esteróide encontrado no sêmen. Originado principalmente nos epidídimos, apresenta-se em maiores concentrações no plasma seminal do que nos espermatozoides (CROSS,

1998). Várias pesquisas vêm sendo realizadas para elucidar de que forma este esteróide está envolvido com a função espermática, mas poucas hipóteses foram testadas experimentalmente. CROSS (1998) sugere que a perda de colesterol afeta diretamente a bicamada lipídica da membrana espermática, estando assim envolvido com a integridade da membrana dos espermatozoides e na inibição da capacitação espermática. Além disso, o mesmo autor sugere que elevadas concentrações de colesterol espermático podem contribuir para a infertilidade em humanos.

As concentrações de cloretos, sódio e potássio foram diretamente relacionadas com a manutenção da excitabilidade dos espermatozoides, pH seminal ótimo e pressão osmótica dentro e fora da célula espermática (DHAMI; SAHNI, 1993). O sódio e o potássio são considerados os principais eletrólitos que influenciam a viabilidade espermática e são encontrados em altas concentrações nos epidídimos (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). A estimativa destes constituintes pode ser usada para predizer a qualidade seminal, a congelabilidade e a fertilidade de touros, ajudando a selecionar reprodutores como doadores de sêmen para uso em programas de inseminação artificial (DHAMI; KODAGALI, 1987). Alguns relatos mostram que o potássio está correlacionado com a viabilidade espermática e, no cão, a presença de sódio e potássio foi correlacionada à motilidade (JAMES et al., 1979).

A fração contendo o líquido pré-espermático apresenta as maiores concentrações de Cl e Na (KARESKOSKI et al., 2005), o que pode afetar a sobrevivência de espermatozoides durante o armazenamento (KARESKOSKI et al., 2006), por isso deve ser evitado em inseminações, pois o mesmo não é

benéfico para motilidade, além de não contribuir para a concentração espermática (KATILA et al., 2005).

Barrier-Battut et al. (2002) avaliaram a composição iônica do plasma seminal em 47 ejaculados provenientes de 17 garanhões de fertilidade comprovada e obtiveram concentrações médias de Ca, Mg e Zn de  $57,5 \pm 42$ ;  $36,3 \pm 19$  e  $1,73 \pm 0,70$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Destes animais, quatro foram classificados como “produtores de sêmen facilmente congeláveis”, outros quatro como “produtores de sêmen não-congeláveis” e sete como “produtores de sêmen intermediários”, de acordo com o número de ejaculados com amostras descongeladas aprovadas em cada animal, e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, não havendo influência de nenhum dos minerais estudados.

## **2.2. Efeito Sazonal Sobre Aspectos Seminais**

O congelamento de sêmen de garanhões é uma prática frequentemente realizada fora da estação reprodutiva na intenção de poupar os animais em atividade durante a estação de monta. Além disso, alguns pesquisadores apontaram melhoria na qualidade seminal durante o inverno, tais como maior motilidade espermática (BLOTTNER et al., 2001) e maior porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (BLOTTNER et al., 2001; JANETT et al., 2003a). Essas observações reforçam a possibilidade de se realizar a criopreservação nessa época do ano, uma vez que um dos pré-requisitos para o sucesso na criopreservação do sêmen de garanhões é a qualidade inicial do mesmo (DOWSETT; KNOTT, 1996; SIEME et al., 2004).

O volume ejaculado tende a aumentar durante a estação de monta (JANETT et al., 2003a, b; ROBALO SILVA et al., 2007; FREITAS, 2010) em função do maior estímulo sexual dos garanhões a partir do contato frequente com éguas em estro (SILVA, 2007), por aumentar a secreção da fração gelatinosa por parte das glândulas sexuais acessórias. Porém, essa característica é pouco importante por não afetar a fertilidade do ejaculado (PICKETT et al., 1974; AMANN, 1993b). Já a concentração espermática pode apresentar-se constante ao longo das estações do ano, em função do aumento concomitante no número total de espermatozoides obtidos por ejaculado durante a estação reprodutiva (ROBALO SILVA et al., 2007; CAZALES et al., 2008; WRENCH et al., 2010), embora Janett et al. (2003a), Silva (2007) Freitas (2010) tenham relatado redução da concentração espermática no verão, quando comparado ao inverno.

Outro fator importante que afeta diretamente a viabilidade espermática é a integridade de membrana. Robalo Silva et al. (2007) e Neves (2014) não observaram diferenças na porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra pelo teste eosina-nigrosina entre as estações do ano. Porém, Freitas (2010) e Gamboa et al. (2010) relataram diferenças sazonais quanto à morfologia da cabeça, cauda e integridade de membrana acrossomal por meio de microscopia de fluorescência, sugerindo adequação do uso do garanhão de acordo com as variações sazonais.

Da mesma maneira, modificações na composição bioquímica do plasma seminal podem ocorrer ao longo das estações climáticas, de acordo com Kosiniak; Bittmar (1981) em função de alterações na atividade das glândulas sexuais acessórias. Em estudo realizado por esses autores, a frutose

apresentou-se duas vezes mais concentrada no plasma seminal de garanhões após a estação de monta quando comparado ao período fora da estação reprodutiva. Da mesma forma, já foi caracterizado em outras espécies a influência sazonal e climática sobre a constituição do plasma seminal. Aguiar et al. (2013) relataram redução nas concentrações de frutose, ácido cítrico, fósforo, magnésio e proteínas totais do plasma seminal de caprinos durante a estação seca no nordeste brasileiro. Singh et al. (1969) observaram maiores concentrações de sódio no plasma seminal de búfalos e touros em períodos de frio e maiores concentrações de compostos nitrogenados durante inverno e primavera no plasma seminal de ambas as espécies. Já Gebauer et al. (1976) relataram a ocorrência de diferenças sazonais nas concentrações de proteínas totais, carboidratos totais e ácido láctico do plasma seminal de garanhões. Em relação à concentração de proteínas totais foram descritas influências sazonais em carneiros (PEREZ-PÉ et al., 2001; CARDOZO et al., 2006), caprinos (TRUDEAU; SANFORD, 1986; STRZEZEK, 2002) e garanhões (JANETT et al., 2003b). A concentração total de proteínas do plasma seminal se apresentou duas vezes maior após a estação de monta do que antes do início da mesma (KOSINIAK; BITTMAR, 1981), embora Freitas (2010) não verificou diferença entre as concentrações médias de proteínas totais solúveis no plasma seminal de garanhões ao longo das quatro estações climáticas.

### **2.3. Princípios da Criopreservação:**

A congelabilidade do sêmen de equinos varia individualmente e entre ejaculados, sendo um dos fatores mais importantes na determinação da taxa de prenhez de éguas, quando o sêmen congelado é utilizado (SAMPER; MORRIS, 1998).

A criopreservação é um procedimento reconhecidamente deletério para as células espermáticas por reduzir sua sobrevivência e, por consequência, seu potencial fertilizante (YESTE et al., 2014). Essa redução na fertilidade ocorre em função do impacto do processo de congelamento/descongelamento sobre a integridade da membrana plasmática e de outros parâmetros funcionais (WATSON, 2000). Danos moleculares resultantes do congelamento de sêmen têm sido estudados extensivamente (PEÑA et al., 2011). Embora animais considerados “maus congeladores” apresentem motilidade e integridade de membrana prejudicadas, existem outros fatores relevantes que afetam a viabilidade espermática no processo de congelamento, tais como produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), redução da atividade mitocondrial (ORTEGA et al., 2008), baixa estabilidade da cromatina (BAUMBER et al., 2003a,b), permeabilidade de membrana, desorganização da bicamada lipídica e concentrações intracelulares de cálcio demonstram diferenças pré- e pós-descongelamento (WATSON, 2000; COOTER et al., 2005; CHAVERIO et al., 2006; WONGTAWAN et al., 2006; YESTE et al., 2014).

Para a realização do processo de criopreservação é imposto aos espermatozoides o primeiro estresse térmico, decorrente da queda da temperatura ambiente (20 °C) para a temperatura de 5 °C. Nesta faixa de

temperatura, a membrana plasmática passa por uma fase de transição do estado líquido cristalino para o de gel, podendo ocorrer perda de movimentos progressivos, alterações nas membranas plasmática e acrossomal, sendo o primeiro desafio para estas células (GRAHAM, 1996). Para que este efeito seja minimizado, é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 °C e 8 °C, pela adição de lipídeos e lipoproteínas ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas (-0,05 °C/min). Deste modo, reduzem-se as alterações na motilidade espermática, no metabolismo, na membrana plasmática e no acrossoma dos espermatozoides (SQUIRES et al., 1999).

Quando a temperatura do meio atinge entre -5 a -10 °C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular que permanece resfriado (não cristalizado), ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extra- e intracelular, ocasionando a desidratação das células (HOLT, 2000). Porém, protegido pela membrana plasmática, o meio intracelular não se congela (MAZUR, 1984). Segundo o mesmo autor, o ponto de congelamento de uma solução é determinado pela concentração de solutos que ela apresenta, de modo que a água do interior da célula flui por osmose para o meio externo e também se congela. Os outros elementos do meio extracelular (sais, proteínas, gorduras) permanecem na porção não congelada (AMANN; GRAHAM, 1993; HOLT, 2000). Com a temperatura diminuindo, mais moléculas de água se cristalizam, resultando em uma concentração maior de solutos na fração não congelada, que formarão os canais não congelados. O volume dos canais não congelados é importante, pois somente as células que estiverem contidas neles irão sobreviver à criopreservação (AMMAN; PICKETT, 1987).

Embora os cristais de gelo deformem a célula, eles não são capazes de romper a membrana plasmática e as modificações causadas são reversíveis (AMANN; PICKET, 1987; JASKO, 1994). A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de se formarem grandes cristais de gelo dentro da célula, o que causariam danos às estruturas internas e/ou da membrana plasmática (SQUIRES et al., 1999).

O sucesso da criopreservação depende da interação de fatores como o crioprotetor utilizado, tipo de diluidor, curva de resfriamento e descongelamento e tipo de envase (COOTER et al., 2005; ANDRABI, 2007; CLULOW et al., 2008). Para que o congelamento seja considerado satisfatório, o espermatozoide deve manter sua capacidade fertilizante após o descongelamento e, para tanto, deve ser capaz de manter a habilidade de produzir energia via metabolismo, manter a configuração normal, integridade da membrana plasmática, motilidade, bem como a integridade acrossomal. O maior risco para a manutenção desses atributos é a formação de cristais de gelo e o movimento de água resultante do gradiente osmótico gerado durante o processo de criopreservação (LEMMA, 2011).

A criopreservação de sêmen de garanhões já se mostrou como poderosa ferramenta nos processos de seleção de progênes e visando à produtividade em maior escala de animais de alto valor zootécnico. Entretanto, estudos são necessários para melhor entender as respostas individuais dos animais aos diversos fatores que influenciam na congelabilidade do sêmen. Os garanhões são reprodutores com padrão de congelabilidade do sêmen diferente daqueles apresentados por bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos, que

são os mais estudados. Faz-se assim necessário maior empenho para entender os eventos envolvidos na criopreservação com estudos moleculares.

## 2. REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, H. A.; EL-BELELY, M. S.; AL-QUARAWI, A. A.; EL-MOUGY, S. A. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 45-49, 2000.
- ADJUWON, C. A.; ILESANMI, A. O.; ODE, E. O.; AKINLADE, K. S. Biophysical and biochemical analysis of semen in infertile Nigerian males. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 217-219, 1996.
- AGUIAR, G.V.; VAN TILBURG, M.F.; CATUNDA, A.G.V.; CELES, C.K.S.; LIMA, I.C.S.; CAMPOS, A.C.N.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO, A.A. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 6-12. 2013.
- ALBERTI, K.; PAPA, F. O.; SIQUEIRA FILHO, E. R.; MELO, C. M.; DELL'AQUA JR., J. A. Efeitos da remoção do plasma seminal na congelabilidade de sêmen bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 124, 2005.
- ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of a-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321–337, 2005.
- ALVARENGA, M. A.; NETO, C. R.; PAPA, F. O. Estratégias para melhorar a qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos. **Sperma**, v. 4, n. 2, p. 172-178, 2014.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.
- AMANN, R. P. Physiology and Endocrinology. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993b. p. 658-685.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders, p. 715-745, 1993a.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7; p. 145-73, 1987.
- ANDRABI S. M. H. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 9, p. 367-369, 2007.

ARIENTI, G.; SACCARDI, C.; CARLINI, E.; VERDACCHI, R.; PALMERINI, C. A. Distribution of lipid and protein in human semen fractions. **Clinica Chimica Acta**, v. 289, p. 111-120, 1999.

ASSREUY, A. M.; CALVETE, J. J.; ALENCAR, N. M.; CAVADA, B. S.; ROCHA-FILHO, D. R.; MELO, S. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1796–17803, 2002.

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.

BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; WESSEL, M. T.; SABEUR, K. Activity of angiotensin- converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. **Theriogenology**, v. 59, p. 901–914, 2003.

BARONOS, S. Seminal carbohydrate in boar and stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**. V. 24, p. 303-305, 1971.

BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAUD, H.; LEGRAND, E.; BRUYAS, J.F.; FIENI, F.; TAINURIER, D.; THORIN, C.; POULIQUEN, H. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. **Theriogenology**, v. 58, p. 229-232, 2002.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **Journal of Andrology**, v. 26; p. 539-549, 2005.

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproductive and Fertility**, v. 68, p. 275-280, 1983.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 621-628, 2003a.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1239–1247, 2003b

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE C.; MANJUNATH, P.; Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 461-470, 2005.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after

cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 75-88, 2001.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 863-873, 1999.

BUSSO, D.; COHEN, D. J.; DA ROS, V.; FISSORE, R.; CUASNICU, P. S. Studies on the participation of epididymal sperm protein DE/CRISP-1 in egg activation, **Cellular Molecular Biology**, v. 49, p. 407-412, 2003.

BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; SALTON, G. D.; MUNARI, F. M.; SCHNEIDER, M. R.; MATTOS, R. C.; LAURINO, J. P.; CIRNE-LIMA, E. O.; JOBIM, M. I. M. Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 2, p. 96-103, 2014.

CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; ALMINAÑA, C.; OLMO, D. DEL.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M. Human fertilization: epididymal hCRISP1 mediates sperm-zona pellucida binding through its interaction with ZP3. **Reproduction and Domestic Animal**, n. 47, (Suppl. 3), p. 12-21, 2012.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. M.; GARCIA, E. M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; MARTÍNEZ, E. A. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1352-1355, 2008.

CAVALCANTE, J. M. M.; AGUIAR, G. V.; SALMITO-VANDERLEY, C. S.; MOURA, A. A. A.; NUNES, J. F. Plasma seminal ovino e sua aplicação na biotecnologia reprodutiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 3, p. 254-259, 2013.

CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 407, p. 201-206, 1997.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; RAIDA, M.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modification, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 365, p. 179-182, 1995b.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemistry Journal**, v. 310, p. 615-622, 1995a.

CALVETE, J. J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 29, p. 411- 426, 1994.

CAMEO, M. S.; BLAQUIER, J. A. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. **Journal Endocrinology**, v. 69, p. 47–55, 1976.

CAMPOS, A. C. N.; NUNES, J. F.; FIGUEIRÊDO, E. L.; ARAÚJO, A. A. Alterações adquiridas pelos espermatozoides durante o trânsito epididimário e a ejaculação. **Ciência Animal**, v. 10, n. 2, p. 77-86, 2000.

CANIO, M. D.; SOGGIU, A.; PIRAS, C.; BONIZZI, L.; GALLI, A.; URBANI, A.; RONCADA, P. Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. **Molecular BioSystems**, v. 10, p. 1264-1271, 2014.

CARDOZO, J. A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 841-850, 2006.

CARVER, D.A.; BALL, B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 58, p. 1587–1595, 2002.

CAZALES, N.; ELHORDOY, D.; COSTA, G.; ESTÉVEZ, J.; HERNÁNDEZ, S.; CARLUCCIO, J. Seasonal variations in equine seminal parameters in Uruguay – Preliminary results. **Animal Reproduction Science**, Abstract, v. 107, p. 315, 2008.

CHAMPION, Z. J.; VICKERS, M. H.; GRAVANCE, C. G.; BREIER, B. H.; CASEY, P. J. Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. **Theriogenology**, v. 57, p. 1793–1800, 2002.

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

CLULOW, J. R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L. H. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 298-308, 2008.

COOTER, P. Z.; GOOLSBY, H. A.; PRIEN, S. D. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 98-99, 2005

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7-11, 1998.

DA ROS V. G.; MUNUCE, M. J.; COHEN, D. J.; MARIN-BRIGGILER, C. I.; BUSSO, D.; VISCONTI, P. E.; CUASNICU, P. S. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1325–1332, 2004.

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.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS, Brasil. Informações epidemiológicas e morbidade, 2015. Disponível em em:<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sia/cnv/qauf.def>> Acesso em: 27 Abr. 2015.

DHAMI, A. J.; KODAGALI, S. B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen of Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Science**, v. 57, n. 12, p. 1283-1286, 1987.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. Comparative assement of certaim biochemical and mineral constituents of seminal plasma and their interrelationships in ox and buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 98-100, 1993.

DIAS, A. J.; MAIA, M. S.; RETAMAL, C. A.; LOPEZ, M. L. Identification and partial characterization of alpha-1,4- glucosidase activity in equine epididymal fluid. **Theriogenology**, v. 61, p.1545–1558, 2004.

DOWSETT, K. F.; KNOTT, L. M. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 397-412. 1996.

DRUART, X.; RICKARD, J. P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P. L.; KERSHAW-YOUNG, C. M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G. V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C. G.; GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**. v. 91, p. 13–22, 2013.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; GOHR, K.; WAGNER, A.; TSOLOVA, M.; PETRUNKINA, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in pig. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p. 536-45, 2005b.

EKHALASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER- PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction Development**, v.70, p. 45–57, 2005a.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SINOWATZ, F.; DE WILKE, I. G.; WABERSKI, D.; TÖPFER-PETERSEN, E. Expression of spermadhesin genes in porcine

male and female reproductive tracts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 32- 41, 2002.

ELLERMAN, D. A.; DA ROS, V. G.; COHEN, D. J.; BUSSO, D.; MORGENFELD, M. M.; CUASNICU, P. S. Expression and structure-function analysis of DE, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1225–1231, 2002.

ENGLE, C. E.; FOLEY, C. W.; WITHERSPOON, D. M.; SCARTH, R. D.; GOETSCH, D. D. Influence of mare uterine tubal fluids on the metabolism of stallion sperm. **American Journal Veterinary Research**. v. 8, p. 1149-1152, 1975.

FINK, E.; SCHILL, W.B.; MISKA, W. Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 247, p. 311-315, 1989.

FIOL DE CUNEO, M.; VINCENTI, L. M.; MARTINI, A. C.; PONCE, A. A.; RUIZ, R. D. Effects of PDC-109 on bovine sperm functional activity in presence or absence of heparin. **Theriogenology**, v. 62, p. 207-216, 2004.

FRASER, L. R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.; BAXENDALE, R. W.; MEDEDOVIC, S.; OSIGUWA, O. O. First messenger regulation of mammalian sperm functions via adenylyl cyclase/cAMP. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p.37-46, 2005.

FREITAS, B.W. **Parâmetros fisiológicos e seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador na Zona da Mata Mineira no decorrer das estações climáticas**. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

GAMBOA, S.; RODRIGUES, A.S.; HENRIQUES, L.; BATISTA, C.; RAMALHO-SANTOS, J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 73, p. 950-958, 2010.

GARCIA, Luiza Almeida Deragon **HSP-1 e HSP-2 no plasma seminal eqüino: efeitos da sazonalidade na concentração e relação com a fertilidade de garanhões**. 2014. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). *Reprodução Animal*. 6ª ed. São Paulo:Manole, p. 167-190. 1995.

GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p.321-339, 2004.

GEBAUER, M.R.; PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; REMMENZA, E.E.; BERNDTSON, W.E. Reproductive Physiology of the Stallion. VII. Chemical Characteristics of Seminal Plasma and Spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 626-632, 1976.

GIESE, A.; JUDE, R.; KUIPER, H.; RAUDSEPP, T.; PIUMI, F.; SCHAMBONY, A.; GUERIN, G.; CHOWDHARY, B. P.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Gene**, v. 299, p. 101–109, 2002b.

GIESE, A.; JUDE, R.; KUIPER, H.; PIUMI, F.; SCHAMBONY, A.; GUERIN, G.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Molecular characterization of the equine AEG1 locus. **Gene**, v. 292, p. 65–72, 2002a.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J. A. M.; MORENO, F. B.; ANDRADE, T. S. SANTOS, A. C. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; MOURA, A. A. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology**, v. 82, p. 697–707, 2014.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America*: **Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

HAASE, B.; SCHLÖTTERER, C.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KUIPER, H.; DISTL, O.; TÖPFER-PETERSEN, E.; LEEB, T. Evolution of the spermadhesin gene family. **Gene**, v. 352, p. 20–29, 2005.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HOSHIBA, H.; SINOWATZ, F. Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 27, n. 5, p. 351-353, 1998.

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, p. 75-77, 2002.

INGLE, S. P; INGLE, R.; SUKESH. The efficiency of the sérum prostate-specific antigen in diagnosing prostatic enlargements. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, p. 82-84, 2013.

JALKANEN, J.; HUHTANIEMI, I.; POUTANEN, M., Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 1268–1274, 2005.

JAMES, R. W.; HEYWOOD, R.; STREET, A. E. Biochemical observations on beagle dog semen. **Veterinary Record**, v. 104, p. 480-482, 1979.

JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 213-221, 2003b.

JANETT, F.; THUN, R.; NIEDERER, K.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, v. 60, p. 453-461, 2003a.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v.10, n.2, p.156-165, 1994.

JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 1059-1067, 1991.

JOBIM, M. I. M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R. M.; SIEME, H.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, 765-771, 2011.

JONSSON, M.; LINSE, S.; FROHM, B.; LUNDWALL A.; MALM, J. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. **Biochemistry Journal**, v. 387, p. 447-453, 2005.

KARESKOSKI M, KATILA T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-56, 2008.

KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction Domestic Animal**, v. 41, p. 33–38, 2006.

KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; SANKARI, S.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Composition of fractionated stallion ejaculates. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 228–230, 2005.

KATILA, T.; KARESKOSKI, M.; AKCAY, E.; REILAS, T.; KOSKINEN, E.; CALVETE, J.J. Seminal plasma studies in stallions. In: Alm, H., Torner, H., Wade, J.F. (Eds.), Havemeyer Foundation Monograph Series, v. 18, p. 3–5, 2005.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M. J.; MATTOS, R.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 318-319, 2001.

KIKUCHI, M.; MIZOROKI, S.; KUBO, T.; OHIWA, Y.; KUBOTA, M.; YAMADA, N.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, p. 679–684, 2003.

KLUG, E. Untersuchungen zur klinischen Andrologie des Pferdes – **die Bedeutung andrologischer Befunde am Hengst für den Zuchteinsatz**. Tese (Livre Docência em Medicina Veterinária). Escola Superior de Veterinária – Hanover, Alemanha, 1982.

KOPPERS, A. J.; REDDY, T.; O'BRYAN, M. K. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 111-117, 2011.

KOSINIAK, K.; BITTMAR, A. Biochemical components of stallion seminal plasma before and after the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 4 p. 39-47. 1981.

LAPOINTE, S.; AHMAND, I.; BUHR, M. M.; SIRARD, M. A. Modulation of postthaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 12, p. 2163-2169, 1996.

LEMMA, A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In: MANAFI, M. (Ed.) **Artificial Insemination in Farm Animals**, InTech, p. 191-216, 2011.

LENZ, R. W.; AX, R. L.; GRIMEK, H. J.; FIRSN, I. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 106, p. 1092-1098, 1982.

LINDEMANN, C.B.; KANOUS, K.S. Regulation of mammalian sperm motility. **Archives of Andrology**, v.23, p.1-22, 1989.

MAEDA, T.; NISHIDA, J.; NAKANISHI, Y. Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. **Development, Growth & Differentiation**, v. 41, p. 715-722, 1999.

MAGDALENO, L.; GASSET, M.; VAREA, J.; SCHAMBONY, A. M.; URBANKE, C.; RAIDA, M.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 420, p. 179-85, 1997.

MAGESTRINI, M.; SEGUIN, F.; BEAU, P.; AKOKA, S.; LE PAPE, A.; PALMER, E. H nuclear magnetic resonance analysis of stallion genital tract fluids and seminal plasma: Contribution of the accessory Sex glands to the ejaculate. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 599-607, 1995.

MANN, T. **Biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. Methuen and Co. Ltda, p. 329-390, 1964.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 179-188, 1974.

MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 23. p. 47-52, 1975.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C., **Male reproduction and semen**. New York, Springer Verlag, p. 23-28, 1981.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109–119, 2002.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 27-37, 1994.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; BAILLARGEON, L.; ROBERTS, K. D. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p.75-81, 1993b.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major Proteins of Bovine Seminal Vesicles Bind to Spermatozoa, **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 27-37, 1993a

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemistry Journal**, v. 3, p. 685–92, 1987.

MARENGO, S. R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 52-63, 2008.

MAZUR, P. Freezing of living cells. Mechanisms and applications. **American Journal Physiology**, v. 247, p. 125-42, 1984.

MENARD, M.; NAUC, V.; LAZURE, C.; VAILLANCOURT, D.; MANJUNATH, P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, p. 349–357, 2003.

MILLER, D. J.; WINER, M. A; AX, R. L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 899-915, 1990.

MORTIMER, S .T.; SWAN, M. A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2139-46, 1998.

MÜLLER, P.; ERLEMANN, K. R.; MULLER, K.; CALVETE, J. J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; MARIENFELD, K.; HERRMANN, A. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. **European Biophysics Journal**, v. 27, p. 33-41, 1998.

MUNGAN, N. A.; MUNGAN, G.; BASAR, M. M.; BAYKAM, M.; ATAN, A. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm mobility. **Archives of Andrology**, v. 47, n. 2, p.113-117, 2001.

NA, R.; WU, Y.; XU, J.; JIANG, H.; DING, Q. Age-specific prostate specific antigen cutoffs for guiding biopsy decision in chinese population. **Plos One**, v. 8, i. 6, p. 1-9, 2013.

NASS, S. J.; MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 3, p. 237-246, 1990.

NEVES, M.G. **Perfil de testosterona e parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador dentro e fora da estação reprodutiva**. 2014. 48p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

NOVAK, S.; SMITH, T. A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M. K.; FOXCROFT, G. R.; DIXON, W. T. Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, v. 74, p. 956–967, 2010.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SOTILLO-GALÁN, Y.; VARELA-FERNÁNDEZ, E.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; MURIEL, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. **Journal of Andrology**, v. 29, p. 213-221, 2008.

PEÑA, F. J.; GARCIA, B. M.; SAMPER, J. C.; APARICIO, I. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, p. 1177-1186, 2011.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Seminal plasma proteins prevents cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 425-434, 2001.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v. 66, p. 307–313, 2006.

PICKETT, B. W.; SULLIVAN, J. J.; BYERS, W. W.; PACE, M. M.; REMMENGA, E. E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **American Fertility Society**, v. 26, n. 2, 1975.

PICKETT, B. W.; GEBAUER, M. R.; SEIDEL, G. E. Jr; VOSS, J. L. Reproductive physiology of the stallion: spermatozoal losses in the collection equipment and gel. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, p. 708-710. 1974.

REINEKE, A.; HESS, O.; SCHAMBONY, A.; PETRUNKINA, A. M.; BADER, H.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm-associated seminal plasma proteins—a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions? **Pferdeheilkunde**, v. 6, p. 531–537, 1999.

REINERT, M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. **Andrologia**, v. 29, n. 4, p. 179-186, 1997.

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

ROBALO SILVA, J.; AGRÍCOLA, R.; BARBOSA, M.; LOPES da COSTA, L. Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.119-125, 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; IBORRA, A.; MARTINEZ, P.; CALVETE, J.J. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. **Reproduction Fertility Development**, v.10, p. 491–497, 1998.

ROMERO, A.; ROMAO, M. J.; VARELA, P. F.; KOLLN, I.; DIAS, J. M.; CARVALHO, A. L.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structural Biology**, v. 4; p. 783-788, 1997.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; FRANCESCHINI, P. H.; ESPER, C. R. Sperm membrane and seminal plasma 2D protein profiles and their relation with bull's fertility. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION **Proceedings...**, p.187, 2004.

SAALMANN, A.; MUNZ, S.; ELLERBROCK, K.; IVELL, R.; KIRCHHOFF, C. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II modules. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58; p. 88-100, 2001.

SAMPER, J, C.; MORRIS C. A. Current methods for a stallion semen cryopreservation: A survey. **Theriogenology**, v.49, p. 895-03, 1998.

SCHAMBONY, A.; HESS, O.; GENTZEL M.; TÖPFER-PETERSEN, E.; Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 53 supl, p. 67-72, 1998b.

SCHAMBONY, A.; GENTZEL, M.; WOLFES, H.; RAIDA, M.; NEUMANN, U.; TÖPFER-PETERSEN, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1387, p. 206–216, 1998a.

SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, v.61, p.769-784. 2004.

SILVA, T. B. **Desenvolvimento e validação de nomogramas para estimativa de risco para câncer de próstata em população brasileira**. 2012. 122 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA, K. M. G. **Efeito da estacionalidade e da adição de antioxidantes em algumas características espermáticas em equino**. 2007. 90 p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

SINGH, B.; MAHAPATRO, B.B.; SADHU, D.P. Chemical composition of cattle and buffalo spermatozoa and seminal plasma under different climatic conditions **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 20, p. 175-178, 1969.

SKANDHAN, K. P. Zinc in normal human seminal plasma. **Andrologia**, v. 13, p. 346-351, 1981.

SCHILL, W.; B. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In: Fritz H, Schimidt I, Dietze G (Ed.). *The kallikrein-kinin system in health and disease*. Hamburg: LimbachVerlag, 1989, p.171-203.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. M.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE, A. Osso e controle hormonal do metabolismo do cálcio e do fosfato: hormônio paratireóide, calcitonina, vitamina D. In: **Bioquímica: mamíferos**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 384-412, 1985.

SOMLEV, B.; HELILI. K.; KARCHEVA, V. Tissue kallikrein activity in seminal plasma of bovine ejaculates with different quality. **Theriogenology**, v. 45, p. 471-475, 1996.

SOUBEYRAND, S.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Phospholipase A2 from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. **Biochemistry Journal**, v. 329, p. 41-47, 1998.

SOUZA, F.F. **Constituintes do plasma seminal e suas interações com as células espermáticas**. Botucatu, 1999. 19 p. Monografia apresentada na disciplina de Seminários em Reprodução Animal.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWAL, D. K.; McCUE P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**, Bulletin nº 9, Fort Collins, Colorado University. 1999.

STICH, K.; BRINSKO, S.; THOMPSON, J.; LOVE, C.; MILLER, C.; BLANCHARD, T.; VARNER, D. Stabilization of extragonadal sperm reserves in stallions: application for determination of daily sperm output. **Theriogenology**, v. 58, p. 397-400, 2002.

STRZEZEK, J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive biology*, v. 2, n. 3, p. 243-266, 2002.

TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 6175-6179, 2000.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipidbinding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1999.

THOMPSON JR, I. M.; LEACH, R. J.; ANKERST, D. P. Prostate cancer detection: a view of the future. **European Urology**, v. 59, p. 191-193, 2011.

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

TÖPFER-PETERSEN, E. Molecules on the sperm's route to fertilization. **Journal of Experimental Zoology**, v. 285, p. 259-266, 1999b.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. **Human Reproduction**, v. 5, p. 314-329, 1999a.

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

TREIN, Cristina Rodrigues. **Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida do plasma seminal equino e a sua relação com a congelabilidade do sêmen**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Medicina Animal) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUSGES, A. S.; ALGHAMDI, A. S.; DAHMS, B.; DOW, C. A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P. T.; MACPERSON, M. L.; POZOR, M.; BUHI, W. C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 171-86, 2005.

TRUDEAU, V.; SANFORD, L. M. Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boar. *Journal of animal science*, v. 63, n. 4, p. 1211-1219, 1986.

UDBY, L.; BJARTELL, A.; MALM, J.; EGESTEN, A.; LUNDWALL, A. K.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N.; KJELDSSEN, L. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. ***Journal of Andrology***, v. 26, n. 3, 2005.

VARELA, P. F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMAO, M. J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSPI/ PSP-II: a zona pellucida binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. ***Journal of Molecular Biology***, v. 274, p. 635-649, 1997.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. ***Theriogenology***, v. 28, n. 5, p. 709-723, 1987.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. ***Reproductive Biology and Endocrinology***, v. 1, p. 39, 2003.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. ***Biology of Reproduction***, v. 59, p. 1-6, 1998.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. ***Reproduction Fertility Development***, v. 7(4), p. 871-89, 1995.

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

WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 183, p. 232-237, 1992.

WITE, I.G. Secreções do órgão reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. ***Reprodução Animal***, 4 ed. São Paulo: Manole, 1988. p. 212-228.

WONG, W. Y.; FLIK, G.; GROENEN, M. W. P.; SWINKELS, D. W.; THOMAS, C. M. G.; COPIUS-PEEREBOOM, J. H. J.; MERKUS, H. M. W. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. The impact of calcium, magnesium, zinc and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. ***Reproductive Toxicology***, v. 15, p. 131-136, 2001.

WONGTAWAN, T.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility after deep intra-uterine artificial

insemination of concentrated low-volume boar semen doses. **Theriogenology**, v. 65, p. 773-787, 2006.

WRENCH, N.; PINTO, C. R. F.; KLINEFELTER, G. R.; DIX, D. J.; FLOWERS, W. L.; FARIN, C. E. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 219-227. 2010.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; ROCHA, L. G.; MARÍN, H.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MIRÓ, J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology**, v. 2, p. 1-13, 2014.

### 3. CAPÍTULO 1

#### BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR E SUA RELAÇÃO COM A CRIOPRESERVAÇÃO

**RESUMO:** O presente estudo avaliou os constituintes bioquímicos do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador e sua correlação com a criopreservação do sêmen. Foram utilizados seis garanhões hípidos da raça Mangalarga Marchador, com idades entre quatro e 15 anos e peso entre 400 e 500 kg. As colheitas foram realizadas no período de junho a agosto de 2013, totalizando 77 amostras. Após a colheita seminal, foram retirados 3 mL de sêmen total para análise bioquímica de cálcio, colesterol, glicose, magnésio, fósforo, proteína total, potássio e sódio. As amostras seminais foram diluídas na proporção 1:1 (sêmen/ diluente) e congeladas para realização dos testes: de motilidade espermática total, vigor espermático, hiposmótico e supravital. Após o descongelamento os ejaculados de cada animal foram separados em grupos de alta (>40 %) e baixa congelabilidade (<40 %). Não foram observadas diferenças nos parâmetros bioquímicos e seminais entre os animais ( $P>0,05$ ), porém foram observadas diferenças na concentração de colesterol e glicose nos animais 1 e 3 ( $P<0,05$ ) sendo de maior concentração no grupo de animais de baixa congelabilidade e correlação negativa do potássio com a motilidade espermática pós-descongelamento. Os constituintes bioquímicos do plasma seminal não influenciam a célula espermática com relação à congelabilidade e não são eficazes como marcadores de congelabilidade do sêmen na espécie equina.

Palavras-chave: Composição bioquímica do sêmen, congelamento, equino, marcadores de congelabilidade.

## ABSTRACT

This study aimed evaluating the biochemical constituents of seminal plasma and its correlation with the Mangalarga Marchador stallions cryopreservation semen. Six healthy ageing four to 15 years old Mangalarga Marchador stallions and weighing between 400 and 500 kg were used. The samples were collected from June to August 2013, totalizing 77 samples. After semen collection, 3 mL from total semen were removed in order to analyze calcium, cholesterol, glucose, magnesium, phosphorus, total protein, sodium and potassium biochemical tests. The semen samples were diluted on a 1:1 (semen/diluent) and frozen for obtaining total sperm motility, sperm vigor, hyposmotic and supravital tests. After thawing, ejaculate from each animal were divided into high (> 40%) and poor (<40%) freezability groups. No differences in biochemical and seminal parameters among animals ( $P>0.05$ ) were observed, but differences for glucose and cholesterol concentrations on animals 1 and 3 ( $P<0.05$ ) were observed; being the highest concentration on the animals from low freezability group and negative correlation between potassium and sperm motility after freezing was reported. The biochemical seminal plasma constituents did not affect sperm cell in respect to freezability, as well as, were not effective on equine species as semen freezability markers.

Key words: Chemical composition of semen freezing, equine, freezability markers.

## INTRODUÇÃO

Avaliando o efeito do plasma seminal sobre os espermatozoides, foi demonstrado que, sob certas condições, determinados constituintes seminais promovem aumento da resistência celular ao choque térmico, estabilizam a membrana espermática (AURICH et al., 1996) e contribuem para a manutenção da sobrevivência espermática (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). Pesquisas demonstraram existir variações individuais quanto à resistência ao congelamento e ao descongelamento (BARROS et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Muito tem sido estudado sobre a composição do plasma seminal (BARRIER-BATTUT et al., 2013; NETO et al., 2013; SABATINI et al., 2014; MORRELL et al. 2014; NEUHAUSER et al., 2015;) e como este pode influenciar a função espermática e a estabilidade da membrana, visto que a qualidade espermática, em termos de motilidade espermática e reconhecimento do oócito serão em grande parte dependente das diferenciações pós-testiculares na estruturação e viabilidade espermática que ocorrem durante o transito epidídimo (GATTI et al., 2004). Porém, a função fisiológica de muitas proteínas, lipídios e hormônios que compõem o plasma seminal e sua interação sobre a célula espermática ainda não está totalmente elucidada.

A função espermática é altamente dependente do ambiente iônico. A composição iônica do plasma seminal varia entre as frações do ejaculado, e também entre animais da mesma espécie, onde se cita o sódio, potássio, cálcio e magnésio considerados os principais cátions e o íon cloreto. No qual o sódio

e o potássio se encontram em maior concentração e o cálcio e magnésio em menor quantidade (WITE, 1988).

O isolamento e a caracterização dos componentes do plasma seminal possibilitam a avaliação de sua influência sobre as células espermáticas. O presente estudo teve por objetivo avaliar os constituintes bioquímicos do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador e sua relação com a criopreservação do sêmen.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Delineamento Experimental**

Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Marchador dos quais foram colhidos no mínimo sete ejaculados por animal. A cada ejaculado foram retirados trélicas de 3 mL de plasma seminal para análise dos constituintes bioquímicos do plasma seminal (cálcio; colesterol; glicose; magnésio; fósforo; proteína total; potássio e sódio), em seguida foram realizadas as análises de motilidade total, vigor espermático, avaliação da funcionalidade da membrana plasmática (HOST) e teste supravital. As amostras foram congeladas e descongeladas para a realização dos mesmos testes pós-descongelamento. Com intuito de avaliar as diferenças entre os animais e entre os ejaculados do mesmo animal, no presente estudo, os ejaculados de cada animal estudado foram separados após seu descongelamento, em alta congelabilidade (motilidade espermática pós- descongelamento > 40 %) e ejaculados com baixa congelabilidade (motilidade espermática pós-

descongelamento < 40 %). Projeto aprovado pela comissão de ética, processo nº 103/2013 no dia 18/02/2014

### **Localização Geográfica**

O experimento foi realizado no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Haras Recreio e Haras Barreiro no município de Viçosa em Minas Gerais, Brasil com altitude de 649 m e tendo como coordenadas geográficas o paralelo de 20°45'14'', latitude Sul, e o meridiano de 42°52'54'', longitude Oeste. O clima é considerado tipo tropical de altitude com chuvas durante o verão.

### **Instalações e Manejo dos Animais**

Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Marchador hígidos com idades entre quatro e 15 anos pesando entre 400 e 500 kg. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram alojados em baias individuais (16 a 25 m<sup>2</sup>) com piquetes externos individuais (225 m<sup>2</sup>) de capim Coast cross (*cynodon-dactylon* (L.) e Tifton (*Cynodon* spp.). A suplementação alimentar foi oferecida duas vezes ao dia, composta de ração concentrada, segundo recomendações do National Research Council (2007), constituída por: 130 g/kg de Proteína bruta, 90 g/kg estrato etéreo, 100 g/kg de fibra bruta (com ingestão de aproximadamente 1 % do peso vivo), capim elefante (*Pennisetum purpureum* cv *Cameroon*) com cana (*Saccharum officinarum*) picada (3,5 % + 1 % do peso vivo, respectivamente), sal mineral e água *ad libitum*. O controle parasitológico foi realizado de acordo com o manejo do Haras. Antes do início do experimento, foi realizado o exame andrológico dos animais, sendo considerados aptos à reprodução, de acordo com os padrões preconizados

pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para a espécie equina (CBRA, 2013).

As colheitas foram realizadas no período de junho a agosto de 2013. Ao iniciar o estudo, cada reprodutor teve sua reserva espermática extra-gonádica esgotada por meio de colheitas diárias por cinco dias consecutivos, seguidos por dois dias de descanso sexual (STICH et al., 2002).

#### **Colheita de Sêmen:**

As colheitas foram realizadas em dias alternados, utilizando fêmeas com cio induzido por 20 mg Cipionato de estradiol (Pfizer®), devidamente contida, para proteção dos garanhões, fazendo uso de vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®) previamente preparada com água a 45 °C. De cada reprodutor foram obtidos no mínimo sete ejaculados para análise dos dados. O ejaculado foi coletado em saco plástico dentro de um copo coletor, sob o abrigo de luz e das variações de temperatura. Após a colheita, a fração gelatinosa do ejaculado foi retirada por filtração e a avaliação imediata foi realizada considerando o aspecto, coloração, volume, concentração, motilidade total e vigor espermático. O volume foi aferido em proveta graduada de 250 mL, previamente aquecida a 37 °C. A motilidade espermática total (0 a 100 %) e o vigor espermático (0 - 5) foram observados em microscópio óptico, com aumento de 200 x, utilizando-se 20 µL de sêmen disposto entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. Uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 950 µL de água destilada para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

### **Congelamento de Sêmen:**

Após as avaliações imediatas, o sêmen foi diluído com Botu-Semen (Botupharma®) na proporção 1:1 e transferido para tubos Falcon de 15 mL para posterior centrifugação a 600 g por 15 minutos (SAMPAIO, 2012).

Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a concentração do pélete calculada em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração espermática, o pélete foi então ressuspendido e homogeneizado com o diluente Botucrio (Botupharma®) para uma concentração final de 50 milhões de espermatozoides / mL (CLULOW et al., 2008). As amostras foram envasadas em 10 palhetas francesas de 0,5 mL, devidamente identificadas, e então, refrigeradas a 5 °C por 20 minutos, conforme Sampaio (2012). Após este período, as palhetas foram acondicionadas em vapor de nitrogênio, a 5 cm do nível da lâmina de nitrogênio líquido, por 15 minutos (LORENZONI, 2010) e posteriormente submersas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico.

### **Descongelamento do Sêmen:**

As palhetas foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos (LORENZONI, 2010) para análises posteriores (motilidade espermática total, vigor espermático, teste hiposmótico (HOST) e teste supravital (vivos e mortos).

### **Avaliação da funcionalidade da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico (HOST)**

As amostras foram avaliadas quanto à integridade funcional da membrana espermática por meio do teste hiposmótico, seguindo metodologia descrita por Alves et al. (2005). Uma alíquota de 100 µL de sêmen foi adicionado em 800 µL de água destilada pré-aquecida a 37 °C, a qual permaneceu incubada por 15 minutos, e posteriormente fixada com 0,5 mL de formol salina tamponada. Por meio de preparação úmida foram contadas 200 células em microscopia óptica com contraste de fase, em aumento de 1.000 x. Foram considerados estruturalmente normais aqueles espermatozoides que durante a incubação sofreram dobramento da cauda e os que não sofreram dobramento foram considerados com membrana afuncional, não foram descontados os dobramentos de cauda oriundos das análises morfológicas.

### **Teste Supravital**

A análise da integridade estrutural de membrana plasmática foi realizada pela coloração supravital utilizando os corantes eosina e negrosina, a 1 e 5 %, respectivamente (SWANSON; BEARDEN, 1951). Amostras de 10 µL de sêmen foram homogeneizadas com 10 µL da solução corante em placa aquecedora. Realizou-se um esfregaço e na leitura foram contadas 100 células que foram classificadas como viáveis aquelas que não se coraram (vivas) e não viáveis aquelas que apresentarem o núcleo corado em vermelho (mortas).

### **Determinação dos componentes Bioquímicos do Plasma Seminal:**

Após a filtragem para remoção do gel foram retiradas aliquotas de 3 mL de sêmen total de cada ejaculado, totalizando 77 amostras de plasma seminal, as quais foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer a -20 °C. Antes das análises, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a 700 g por 20 minutos para remoção do plasma seminal, caso o sobrenadante permanecesse turvo, o procedimento fora repetido até a clarificação do sobrenadante, para cada análise foram utilizados 300 µL de plasma seminal. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas no Departamento de Medicina Veterinária – UFV.

Nas amostras de plasma seminal foram avaliadas as concentrações de cálcio (Ca), colesterol (Col), glicose (Gli), magnésio (Mg), fósforo (P), proteínas totais (Pt), potássio (K) e sódio (Na). Foi utilizado Fotômetro de Chama para as análise do sódio e potássio e para todas as outras análises foram utilizados kits da InVitro Diagnóstica em aparelho de automação HumaStar300, seguindo as metodologias descritas na Tabela 1.

**Tabela 1-** Métodos empregados para a análise bioquímica do plasma seminal de garanhões

<b>Análise Bioquímica</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
Cálcio total	O-cresolftaleína-complexona (CFC)	Gitelman, 1967.
Magnésio	Azul de Xilidila	Mann; Yoe, 1956.
Glicose	GPO-PAP	Barham; Trinder, 1972.
Fósforo	Fosfomolibdato UV	Daly; Ertingshausen, 1972.
Sódio	Fotometria de chama	Korzun; Miller, 1987.
Potássio	Fotometria de chama	Korzun; Miller, 1987.
Colesterol	Enzimático-colorimétrico com LCF	Schettler; Nüssel, 1975.
Proteína	Biureto	Meulemans, 1960.

#### **Análise Estatística:**

Para avaliação dos dados foi empregado o programa estatístico SAEG-9.1 (SAEG-UFV, 2007). Para todas as características quantitativas, os dados foram submetidos aos testes de Lilliefors e Bartlett e Cochran para verificar a normalidade dos dados e a homocedacidade das variáveis, respectivamente, e posteriormente submetidas a ANOVA, e a significância avaliada pelo teste F. Os dados que não atenderam as premissas da ANOVA foram analisados pela análise não paramétrica e as médias testadas pelo teste de Wilcoxon. Para as análises adotou-se a significância e 5 % de probabilidade de erro.

Para avaliar a correlação entre a motilidade espermática total do semen descongelado e os constituintes bioquímicos, foi feito o teste de correlação Simples de Pearson com 5 % de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade espermática total diferiu entre os ejaculados de alta e baixa congelabilidade ( $P < 0,05$ ; Tabela 2) no tempo 0 pós- descongelamento, diferença esta já esperada, visto que este foi o critério adotado para a separação das amostras. Estudos avaliando os parâmetros seminais pós- descongelamento, demonstram existir diferenças entre raças, entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo quanto à sobrevivência espermática ao processo de criopreservação (RESENDE, et al., 2013; COSTA et al., 2014). Segundo Alvarenga et al. (1996) existe um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao processo de criopreservação, onde as raças Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista apresentam os piores índices de congelabilidade, quando comparadas com as raças de hipismo (Hannoveriana, Holstein e Trackenner) e Quarto-de-Milha, que apresentam sêmen com bons padrões de motilidade espermática pós-descongelamento. Estes mesmos autores, estimam que apenas 30 a 40 % dos garanhões das raças mencionadas produzam sêmen adequado para a criopreservação (ALVARENGA et al., 2005). Um dos fatores relacionados à resistência ao processo de criopreservação é a composição da membrana plasmática dos espermatozoides, que está diretamente relacionada com a sua fluidez e integridade (ALVARENGA et al., 2014). Segundo Hartwig et al. (2013) um dos motivos para essa situação são os critérios de seleção utilizados, os quais levam em consideração principalmente a genealogia e o desempenho em competições, deixando em segundo plano os parâmetros de fertilidade. Medeiros (2007) observaram a partir de dados de fertilidade, que existe diferença entre indivíduos em relação à resistência osmótica dos

espermatozoides frente aos crioprotetores, fato este evidenciado principalmente na raça Mangalarga Marchador.

Em relação ao cálcio, nos animais 1, 2, 3 e 7 foram observados valores inferiores, mas não significativos nos ejaculados com baixa congelabilidade em relação aos de alta congelabilidade (Tabela 3), a média total dos ganhões do presente estudo foi de 4,3 mg/dL (Tabela 4), porém não foram observadas diferenças na concentração deste íon entre os animais ( $P>0,05$ ). Zahn (2006) em estudo avaliando diferentes constituintes bioquímicos utilizando método de bioquímica seca (Vitros-Johnson) no plasma seminal de ganhões de diferentes raças, observou valores de cálcio para alta congelabilidade de 10,36 mg/dL e para baixa congelabilidade de 10,31 mg/dL, não diferindo entre os grupos estudados, porém os valores foram superiores aos obtidos no presente estudo. Da mesma forma, Ewing e Chang (1986); Wite (1988) e Setchel (1993) determinaram que a concentração de cálcio no plasma seminal de ganhões é de 26 mg/dL, sendo muito superiores ao presente estudo. Segundo Wong et al. (2001), o cálcio é um elemento essencial, sendo um regulador crucial para muitos processos fisiológicos em todas as células vivas, incluindo os espermatozoides. Este cátion pode ser encontrado no plasma seminal ou no interior dos espermatozoides, na forma ionizada ou ligado a substâncias como o ácido cítrico ou proteínas (MANN; L-MANN, 1981). Dentre as funções mais importantes do cálcio, destacam-se o seu envolvimento com a motilidade espermática (pela hiperativação celular) e na capacitação espermática (pelo influxo de Cálcio).

Apesar de diversos estudos acerca das funções do cálcio, a relação entre o cálcio e os parâmetros seminais ainda é controversa. Abdel-Rahman et

al. (2000) observaram que altas concentrações de cálcio seminal promoveram redução na dos espermatozoides, pois afetam o metabolismo da célula, já Wong et al. (2001) não constataram nenhuma associação benéfica ou adversa entre o cálcio e a motilidade espermática.

Em relação ao colesterol, foi observado diferença ( $P < 0,05$ ) entre a alta e a baixa congelabilidades nos animais 1 e 3, onde foi verificado maiores valores deste componente nos ejaculados de baixa congelabilidade ( $P < 0,05$ ; Tabela 3). A média total dos ganhões foi de 5,5 mg/dL (Tabela 4). O valor observado foi menor do que o descrito por Zahn (2006) que obteve médias de 9,71 mg/dL para alta congelabilidade e 10,86 mg/dL para baixa congelabilidade. Segundo Cross (1998), em ganhões o colesterol é o principal esteróide encontrado no sêmen, originado principalmente dos epidídimos. Apresenta-se em maiores concentrações no plasma seminal do que nos espermatozoides, sendo o fator que mais varia em quantidade quando comparado a outras espécies, entre animais da mesma espécie e entre ejaculados do mesmo animal. Segundo o autor, a perda de colesterol afeta diretamente a bicamada lipídica da membrana espermática. O colesterol está ainda envolvido com a integridade da membrana e na inibição da capacitação espermática, além de estar associado à infertilidade em humanos quando em altas concentrações.

Acredita-se que a maior parte do colesterol presente nos espermatozoides seja proveniente do ambiente (CROSS, 1998). Para Yanagimachi (1994) as diferenças na quantidade de colesterol na membrana plasmática podem não estar apenas relacionadas com índices de capacitação, mas também podem afetar a fertilidade e a capacidade do ejaculado de um ganhão em suportar o resfriamento e congelamento.

A proporção colesterol:fosfolípido na membrana plasmática na espécie equina é de 0,36 (DARIN-BENNETT; WHITE, 1977; CROSS, 1998), um valor intermediário quando comparado com valores de varrões (0,26) (AMANN; PICKETT, 1987) e touros (0,51-0,53) (PARKS; GRAHAM, 1992). Várias pesquisas estão sendo realizadas no intuito de elucidar de que forma este esteróide está envolvido com a função espermática (HARWTING et al.,2013)

A ocorrência das diferenças ( $P < 0,05$ ; Tabela 3) na concentração de colesterol dos garanhões 1 e 3, associada as diferenças ( $P < 0,05$ ; Tabela 2) visualizadas no teste supravital no tempo 0 no animal 1 e no supravital pré diluição no animal 3, nos quais foram visto uma diminuição na integridade das membranas na baixa congelabilidade, sugerem que o aumento de colesterol pode não ter sido benéfico aos espermatozoides, porém mais estudos avaliando a interação do colesterol do plasma seminal com a membrana dos espermatozoides em animais da raça Mangalarga Marchador devem ser realizados.

O plasma seminal é rico em açúcares como frutose, glicose, manose, galactose, arabinose, ribose, fucose, sorbitol, inositol, sendo a frutose o principal açúcar presente no plasma seminal de touros (EWING; CHANG, 1986) e carneiros (AMANN; GRAHAM, 1993). Já, o plasma seminal de garanhões contém quantidades consideráveis de glicose e pouca frutose (0,82 e 0,02 mg/mL, respectivamente (AMANN; GRAHAM, 1993). Para Williams e Ford (2001), os açúcares têm sido relacionados com a fertilidade, pois servem de substrato para produção de energia aos espermatozoides, além ter efeito benéfico no processo de capacitação, na fertilidade do oócito (penetração da zona pelúcida), fusão de membranas entre espermatozoides e oócito, no

metabolismo e na motilidade dos espermatozoides (TRAVIS et al., 2001). No presente estudo foi verificada diferença ( $P < 0,05$ ; Tabela 3) nos ganhões 4 e 6, no qual os ejaculados de baixa congelabilidade apresentaram valores superiores para glicose. Zahn (2006), também observou as maiores concentrações de glicose para os animais de baixa congelabilidade (16 mg/dL) em relação ao de alta congelabilidade (12,71 mg/dL), e no presente estudo a média geral dos ganhões foi de 10,0 mg/dL (Tabela 4). Resultado contraditório foi observado em relação ao vigor espermático, no animal 4 foi observado melhor vigor pré diluição no grupo de baixa congelabilidade, este resultado pode estar associado a maior concentração de glicose ( $P < 0,05$ ) neste animal em baixa congelabilidade (vigor 3,4 e Gli 10,0 mg/dL), já no animal 6, o melhor vigor no tempo 0 foi observado na alta congelabilidade que apresentaram baixa concentração de glicose (vigor 3 e 11 mg/dL glicose, vigor 2,2 e 15 mg/dL de glicose) respectivamente (Tabelas 2 e 3). No animal 6 as concentrações de glicose tanto em alta quanto em baixa congelabilidade (11,0 e 15,5 mg/dL) foram superiores as observadas no animal 4 (7,4 e 10,0 mg/dL).

Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) na concentração do cátion magnésio (Mg) e a média dos animais foi de 1,9 mg/dL (Tabela 4). Os resultados obtidos não corroboraram com os revisados na literatura, Zahn (2006) observou que os animais de alta congelabilidade apresentaram 11,66 mg/dL de Mg e os animais de baixa congelabilidade 12,53 mg/dL. De maneira geral Ewing e Chang (1986); Wite (1988) e Setchel (1993) observaram que a concentração de Mg no plasma seminal de ganhões é de 9 mg/dL. Portanto, valores bem superiores aos registrados no presente estudo.

A grande variação de resultados observados na literatura pode estar associada ao fato de que nos estudos foram utilizadas diferentes raças de garanhões, não havendo uma padronização racial dos animais, os autores citados acima, não fizeram nenhuma citação em relação à adição de suplementos alimentares, sazonalidade, ou quaisquer fatores que pudessem justificar tais diferenças. Outro fator que pode provocar tais variações está relacionado com a técnica empregada e os kits utilizados para as análises da composição bioquímica havendo também a necessidade de padronização das mesmas, visto que a grande maioria dos kits utilizados não são específicos para análise do plasma seminal. A média observada nos garanhões para a concentração de fósforo no plasma seminal foi de 4,4 mg/dL (Tabela 4). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os ejaculados dos animais (Tabela 3), porém Zahn (2006) observou diferença nos animais de baixa congelabilidade de sêmen e mostrou correlação negativa entre os valores de motilidade total do sêmen congelado e o fósforo no plasma seminal ( $r = - 0,71$ ).

As concentrações de proteína total não apresentaram diferenças entre os grupos de alta e baixa congelabilidade, com 0,9 mg/dL de média total (Tabela 4). Os valores obtidos estão bem próximos aos observados na literatura de 1 mg/dL (Ewing e Chang, 1986; Wite, 1988 e Setchel, 1993), e aos valores de 1,21 mg/dL (animais de alta congelabilidade) e 1,27 mg/dL (animais de baixa congelabilidade) registrados por Zahn (2006).

Em relação às concentrações de sódio e potássio, não foram observadas diferenças quanto as concentrações destes compostos no plasma seminal ( $P > 0,05$ ), com valores médios de 109,7 e 14,8 mEq/L, respectivamente. Apenas o potássio correlacionou-se negativamente com a

motilidade espermática pós- descongelamento (Tabela 5), porém com valores muito baixos ou nulos ( $r = -0,0060$ ,  $P = -0,05$ ).

Para Wales e White (1958; 1965) o excesso de potássio reduz a motilidade dos espermatozoides. Segundo Dhimi e Kodagali (1987) e Dhimi e Sahni (1993), as concentrações de sódio e potássio foram diretamente relacionados com a manutenção da excitabilidade dos espermatozoides, pH seminal ótimo e pressão osmótica constante dentro e fora das células espermáticas. O sódio e o potássio são considerados os principais eletrólitos que influenciam a viabilidade espermática. Nesse sentido, Dhimi e Kodagali (1987) preconizam que a determinação da concentração destes constituintes pode ser usada para prever a qualidade seminal, a congelabilidade e a fertilidade de touros, ajudando a selecionar reprodutores para a inseminação artificial.

No homem, a alta concentração de potássio no órgão reprodutor masculino foi correlacionado à falta de motilidade de espermatozoides obtidos dos epidídimos (BATTERSBY; CHANDLER, 1977). Para Crabo et al. (1976) o potássio é captado pelos espermatozoides e utilizado em diversas reações metabólicas. Altas concentrações desse íon têm sido implicadas no aumento da taxa de reação acrossomal em espermatozoides humano avaliados *in vitro*, devido à estimulação do influxo de cálcio (ROBLERO et al., 1988, KUMAR et al., 2000). Além disso, meios diluentes contendo maiores concentrações de cátions, entre eles o potássio, elevam o pH intracelular espermático proporcionando aumento da motilidade espermática progressiva. Contrariamente, quando o pH intracelular é baixo, a motilidade espermática se mantém por um tempo mais prolongado (JONES; BAVISTER, 2000).

No presente estudo os ejaculados de cada garanhão foram divididos em alta e baixa congelabilidade, visando identificar possíveis fatores intrínsecos dos animais que pudessem elucidar de alguma forma os problemas relacionados ao processo de criopreservação que refletem em baixas taxas de fertilidade com uso de sêmen congelado. As diferenças observadas neste estudo em relação aos parâmetros seminais podem estar associadas à sazonalidade. Segundo Geubauer et al. (1976), os cavalos são reprodutores sazonais, e os efeitos no plasma seminal parecem ser mais evidentes do que nas características espermáticas, entretanto Freitas (2010) observou diferenças em relação ao volume e a motilidade espermática em diferentes estações do ano, no qual o outono apresentou os melhores parâmetros seminais após o resfriamento de sêmen na raça Mangalarga Marchador. No presente estudo foi possível observar que alterações nas concentrações de colesterol no plasma seminal (animais 1 e 3), podem ter influenciado na capacidade do ejaculado em suportar o resfriamento e congelamento, evidenciado nas alterações da motilidade espermática e dos testes supravitais dos animais em questão. As diferenças sazonais são provavelmente causadas por alterações dos esteróides sexuais dos garanhões (HOFFMANN; LANDECK 1999). A concentração de glicose no plasma seminal (animal 4 e 6) também influenciou o vigor espermático dos animais em questão, sendo a principal fonte energética dos espermatozoides de garanhões.

**Tabela 2** – Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Machador

avaliados em análises de rotina e testes complementares de sêmen pré e pós criopreservação

Animal	Congelabilidade	Mot Pré dil	Mot Pós dil	Mot 0	Vigor Pré	Vigor 0	SV Pré	SV 0	Host Pré	Host 0
1	Alta	75,7±7,9 <sup>a</sup>	80,0±3,2 <sup>a</sup>	50,0±15,3 <sup>a*</sup>	3,1±0,4 <sup>a*</sup>	3,5±0,4 <sup>a*</sup>	80,7±6,1 <sup>a</sup>	57,6±16,1 <sup>a</sup>	88,7±10,8 <sup>a</sup>	27,7±5,6 <sup>a</sup>
	Baixa	75,5±7,2 <sup>a</sup>	76,5±9,4 <sup>a</sup>	22,0±10,6 <sup>b</sup>	3,4±0,4 <sup>a</sup>	2,6±0,5 <sup>b</sup>	80,1±6,3 <sup>a</sup>	41,1±17,2 <sup>b</sup>	83,3±6,3 <sup>a</sup>	20,4±7,1 <sup>a</sup>
	Média	75,6±7,3	77,8±7,7	33,5±18,8	3,3±0,4	3,0±0,6	80,9±6,1	47,9±18,2	85,5±8,6	24,4±7,1
2	Alta	76,5±4,1 <sup>a</sup>	80,0±8,2 <sup>a</sup>	56,4±14,2 <sup>a</sup>	3,4±0,5 <sup>a</sup>	3,2±0,4 <sup>a</sup>	87,0±5,3 <sup>a</sup>	62,6±14,1 <sup>a</sup>	91,8±5,9 <sup>a</sup>	50,0±11,8 <sup>a</sup>
	Baixa	75,7±7,9 <sup>a</sup>	77,5±8,2 <sup>a</sup>	25,7±7,9 <sup>b</sup>	3,1±0,2 <sup>a</sup>	2,9±0,4 <sup>a</sup>	86,9±4,5 <sup>a</sup>	40,0±7,6 <sup>b</sup>	93,4±3,7 <sup>a</sup>	25,6±5,4 <sup>b</sup>
	Média	76,2±5,7	79,1±8,0	44,4±19,4	3,3±0,4	3,1±0,4	86,9±4,8	53,8±16,3	92,4±5,1	39,3±15,6
3	Alta	76,7±5,8 <sup>a</sup>	78,3±2,9 <sup>a</sup>	53,3±15,3 <sup>a</sup>	3,0±0,0 <sup>a</sup>	3,3±0,6 <sup>a</sup>	84,0±2,6 <sup>a</sup>	58,3±5,0 <sup>a</sup>	83,3±6,5 <sup>a</sup>	42,7±23,0 <sup>a</sup>
	Baixa	60,0±10,5 <sup>a</sup>	69,2±9,7 <sup>a</sup>	25,7±7,9 <sup>b</sup>	3,1±0,2 <sup>a</sup>	2,9±0,2 <sup>a</sup>	77,7±6,5 <sup>b</sup>	52,1±5,0 <sup>a</sup>	84,6±10,9 <sup>a</sup>	37,0±0,0 <sup>a</sup>
	Média	65,6±12,1	72,2±9,1	34,0±16,5	3,1±0,2	3,0±0,4	79,8±6,2	54,0±13,1	84,1±9,5	41,2±19,0
4	Alta	65,0±21,2 <sup>a</sup>	74,0±13,4 <sup>a</sup>	50,0±10,0 <sup>a</sup>	2,8±0,4 <sup>a</sup>	3,2±0,3 <sup>a</sup>	84,2±5,3 <sup>a</sup>	65,0±8,9 <sup>a</sup>	91,8±2,0 <sup>a</sup>	41,8±8,9 <sup>a</sup>
	Baixa	67,5±15,0 <sup>a</sup>	77,5±9,6 <sup>a</sup>	26,5±11,1 <sup>b</sup>	3,4±0,5 <sup>b</sup>	2,6±1,1 <sup>a</sup>	87,0±4,2 <sup>a</sup>	56,5±14,7 <sup>b</sup>	91,2±5,0 <sup>a</sup>	44,7±18,8 <sup>a</sup>
	Média	66,1±17,6	75,6±11,3	39,4±15,9	3,1±0,5	2,9±0,8	85,4±4,8	61,2±11,9	91,6±3,4	42,9±12,1
6	Alta	75,0±0,0 <sup>a</sup>	72,5±3,5 <sup>a</sup>	40,0±0,0 <sup>a*</sup>	3,0±0,0 <sup>a*</sup>	3,0±0,0 <sup>a*</sup>	88,0±8,5 <sup>a*</sup>	41,5±4,9 <sup>a</sup>	94,0±7,1 <sup>a</sup>	19,0±0,0 <sup>a</sup>
	Baixa	70,0±14,1 <sup>a</sup>	62,5±3,5 <sup>a</sup>	20,0±0,0 <sup>b</sup>	3,0±0,0 <sup>a</sup>	2,2±0,3 <sup>b</sup>	91,0±2,8 <sup>a</sup>	48,0±2,8 <sup>a</sup>	81,5±12,0 <sup>a</sup>	56,0±12,7 <sup>a</sup>
	Média	72,5±8,7	67,5±6,4	30,0±11,5	3,0±0,0	2,6±0,5	89,5±5,4	44,7±5,0	87,7±10,8	43,7±23,2
7	Alta	77,5±3,5 <sup>a</sup>	75,0±7,1 <sup>a</sup>	40,0±0,0 <sup>a</sup>	3,0±0,0 <sup>a</sup>	3,5±0,0 <sup>a*</sup>	93,0±1,4 <sup>a</sup>	46,0±11,3 <sup>a</sup>	95,5±2,1 <sup>a</sup>	34,5±16,3 <sup>a</sup>
	Baixa	71,7±2,9 <sup>a</sup>	70,0±0,0 <sup>a</sup>	16,7±5,8 <sup>b</sup>	3,0±0,0 <sup>a</sup>	3,0±0,0 <sup>b</sup>	91,7±5,0 <sup>a</sup>	29,0±7,8 <sup>a</sup>	91,5±0,7 <sup>a</sup>	61,0±0,0 <sup>a</sup>
	Média	74,0±4,2	72,0±4,5	26,0±13,4	3,0±0,0	3,2±0,3	92,2±3,7	35,8±12,2	93,5±2,6	43,3±19,1

<sup>ab</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p > 0,005$ ) pelo teste F ou \* Wilcoxon. Mot Pré dil: motilidade pré diluição; Mot Pós dil: motilidade pós diluição; Mot 0: motilidade tempo 0 do sêmen descongelado; Vigor Pré dil: vigor pré diluição; Vigor 0: vigor no tempo 0 do sêmen descongelado; SV Pré: supravital pré diluição; SV 0: supravital no tempo 0 do sêmen descongelado; Host Pré: host pré diluição; host 0: host no tempo 0 do sêmen descongelado.

**Tabela 3**– Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros bioquímicos de cálcio (Ca), colesterol (Col), glicose (Gli), magnésio (Mg), fósforo (P), proteínas totais (PT), potássio (K) e sódio (Na) em relação a congelabilidade do ejaculado de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Animal	Congelabilidade	Ca (mg/dL)	Col (mg/dL)	Gli (mg/dL)	Mg (mg/dL)	P (mg/dL)	PT (g/dL)	K (mEq/L)	Na (mEq/L)
1	Alta	3,0±0,8 <sup>a</sup>	5,1 ±2,0 <sup>b</sup>	7,4±3,1 <sup>a</sup>	1,9±0,2 <sup>a</sup>	4,3±0,7 <sup>a</sup>	1,0±0,5 <sup>a</sup>	17,1±1,0 <sup>a</sup>	112,4±4,8 <sup>a</sup>
	Baixa	2,7±0,7 <sup>a</sup>	8,3±3,2 <sup>a</sup>	9,7±2,1 <sup>a</sup>	1,8±0,6 <sup>a</sup>	4,8±0,9 <sup>a</sup>	1,3±0,6 <sup>a</sup>	17,6±1,4 <sup>a</sup>	108,1±13,3 <sup>a</sup>
	Média	2,8±0,7	6,9±3,1	8,7±2,8	1,9±0,1	4,6±0,9	1,2±0,5	17,4±1,2	110,0±10,4
2	Alta	5,4±2,5 <sup>a</sup>	6,4±2,9 <sup>a</sup>	11,2±3,5 <sup>a</sup>	1,8±0,8 <sup>a</sup>	7,1±10,0 <sup>a</sup>	0,8±0,3 <sup>a</sup>	15,3±3,4 <sup>a</sup>	109,8±11,5 <sup>a</sup>
	Baixa	4,8±2,6 <sup>a</sup>	4,9±2,5 <sup>a</sup>	11,1±3,8 <sup>a</sup>	1,7±0,9 <sup>a</sup>	3,8±1,0 <sup>a</sup>	0,6±0,3 <sup>a</sup>	15,9±1,5 <sup>a</sup>	114,4±7,0 <sup>a</sup>
	Média	5,1±2,5	5,8±2,8	11,2±3,5	1,8±0,9	5,8±7,7	0,7±0,3	15,6±2,7	111,7±9,9
3	Alta	5,3±2,6 <sup>a</sup>	2,3±0,6 <sup>b</sup>	9,3±2,1 <sup>a</sup>	2,3±0,1 <sup>a</sup>	3,4±0,9 <sup>a</sup>	0,5±0,6 <sup>a</sup>	15,8±3,5 <sup>a</sup>	129,7±14,6 <sup>a</sup>
	Baixa	4,9±1,8 <sup>a</sup>	5,4±1,7 <sup>a</sup>	12,0±3,8 <sup>a</sup>	2,2±0,8 <sup>a</sup>	3,8±1,0 <sup>a</sup>	0,7±0,5 <sup>a</sup>	12,9±3,6 <sup>a</sup>	100,4±32,6 <sup>a</sup>
	Média	5,0±1,9	4,5±2,1	11,2±3,5	2,2±1,0	3,6±0,9	0,6±0,3	13,7±3,7	109,2±30,9
4	Alta	2,9±0,9 <sup>a</sup>	5,4±1,5 <sup>a</sup>	7,4±1,5 <sup>b</sup>	2,0±0,1 <sup>a</sup>	5,3±1,6 <sup>a*</sup>	0,8±0,1 <sup>a</sup>	13,2±3,6 <sup>a</sup>	100,2±19,6 <sup>a</sup>
	Baixa	4,3±0,9 <sup>a</sup>	7,5±2,3 <sup>a</sup>	10,0±1,1 <sup>a</sup>	2,0±0,1 <sup>a</sup>	4,3±2,0 <sup>a*</sup>	1,0±0,2 <sup>a</sup>	11,5±2,9 <sup>a</sup>	93,2±20,1 <sup>a</sup>
	Média	3,5±1,1	6,3±2,1	8,6±1,9	2,0±0,1	4,8±1,8 <sup>*</sup>	0,9±0,2 <sup>a</sup>	12,5±3,2	97,1±18,9
6	Alta	3,1±0,1 <sup>a</sup>	7,0±1,4 <sup>a</sup>	11,0±1,4 <sup>b</sup>	1,7±0,4 <sup>a</sup>	5,3±0,7 <sup>a</sup>	1,6±0,4 <sup>a</sup>	15,0±1,4 <sup>a</sup>	116,0±15,6 <sup>a</sup>
	Baixa	8,0±3,7 <sup>a</sup>	7,0±5,7 <sup>a</sup>	15,5±3,5 <sup>a</sup>	1,9±0,3 <sup>a</sup>	4,1±1,9 <sup>a</sup>	1,5±0,1 <sup>a</sup>	13,6±1,9 <sup>a</sup>	97,5±36,1 <sup>a</sup>
	Média	5,6±3,6	7,0±3,4	13,2±3,4	1,8±0,3	4,7±1,3	1,6±0,2	14,3±1,6	106,7±25,1
7	Alta	3,4±0,2 <sup>a</sup>	5,0±1,4 <sup>a</sup>	7,5±0,7 <sup>a</sup>	1,9±0,1 <sup>a</sup>	4,7±0,1 <sup>a</sup>	0,6±0,5 <sup>a</sup>	14,8±2,3 <sup>a</sup>	117,0±9,9 <sup>a</sup>
	Baixa	3,2±0,5 <sup>a</sup>	4,0±3,0 <sup>a</sup>	6,7±0,6 <sup>a</sup>	2,0±0,1 <sup>a</sup>	3,3±1,3 <sup>a</sup>	0,5±0,3 <sup>a</sup>	17,7±0,7 <sup>a</sup>	129,0±4,4 <sup>a</sup>
	Média	3,3±0,4	4,4±2,3	7,0±0,7	2,0±0,1	3,9±1,2	0,6±0,3	16,5±2,0	124,2±8,8

<sup>ab</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p > 0,005$ ) pelo teste F ou \* Wilcoxon. Ca: Cálcio; Col: Colesterol; Gli: Glicose; Mg: Magnésio; P: Fósforo; PT: Proteína total; K: Potássio; Na: Sódio.

**Tabela 4** – Valores médios e erro-padrão de cálcio (Ca), colesterol (Col), glicose (Gli), magnésio (Mg), fósforo (P), proteínas totais (PT), potássio (K) e sódio (Na) no plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Machador

Variáveis Bioquímicas	Garanhões							Média Total
	1	2	3	4	6	7		
<b>Ca (mg/dL)</b>	2,88±0,19	4,97±0,56	5,25±0,68	3,71±0,33	5,93±1,36	3,31±0,19	4,3	
<b>Col (mg/dL)</b>	6,83±0,69	5,45±0,60	4,54±0,73	6,18±0,61	5,57±1,23	4,13±0,69	5,5	
<b>Gli (mg/dL)</b>	8,56±0,62	10,25±0,89	11,54±1,08	9,18±0,85	13,71±2,32	6,88±0,52	10,0	
<b>Mg (mg/dL)</b>	1,87±0,1	1,79±0,08	2,17±0,22	1,99±0,13	1,84±0,3	1,99±0,18	1,9	
<b>P (mg/dL)</b>	4,80±0,31	5,41±1,60	3,47±0,25	4,75±0,48	4,11±0,49	3,60±0,38	4,4	
<b>Pt (mg/dL)</b>	1,13±0,12	0,68±0,07	0,64±0,09	0,86±0,05	1,34±0,21	0,59±0,10	0,9	
<b>K (mEq/L)</b>	17,47±0,27	15,18±0,61	13,32±0,93	12,93±0,93	13,57±0,62	16,38±0,66	14,8	
<b>Na (mEq/L)</b>	111,17±2,48	111,10±2,47	107,31±7,56	99,18±5,38	104,57±8,85	125,00±3,64	109,7	

Valores médios e erro padrão dos parâmetros bioquímicos Ca: Cálcio; Col: Colesterol; Gli: Glicose; Mg: Magnésio; P: Fósforo; PT: Proteína total; K: Potássio; Na: Sódio.

## **CONCLUSÕES**

Os constituintes bioquímicos do plasma seminal não influenciam as células espermáticas com relação à congelabilidade, sugerindo que os mesmos não se mostram eficazes como marcadores de congelabilidade na espécie equina.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, H. A.; EL-BELELY, M. S.; AL-QUARAWI, A. A.; EL-MOUGY, S. A. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 45-49, 2000.
- ALVARENGA, M. A.; NETO, C. R.; PAPA, F. O. Estratégias para melhorar a qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos. **Sperma**, v. 4, n. 2, p. 172-178, 2014.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.105-113, 2005.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breed and spermatid parameters over equine semen freezability. In: Symposium on Stallion Semen, 1996, Amersfoort. Proceedings... Amersfoort, SSS, p. 82, 1996.
- ALVES, S. G. G.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SNOECK, P. P. N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R. F.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; MELO, M. I. V.; HENRY, M. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen equino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 219-225, 2005.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders, p. 715-745, 1993
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7; p. 145-73, 1987.
- AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.
- BARHAM, D., TRINDER, P. An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst (Lond)** v. 97, p. 142–145, 1972.
- BARRIER-BATTUT, I.; BONNET, C.; GIRAUDO, A.; DUBOIS, C.; CAILLAUD, M.; VIDAMENT, M. Removal of Seminal Plasma Enhances Membrane Stability on Fresh and Cooled Stallion Spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v. 48, p. 64–71, 2013.
- BARROS, L. O.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F. C.; SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P.; CARNEIRO, G. F. Efeito da adição de glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen equino. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. v. 65, n. 2, p. 430-438, 2013.

BATTERSBY, S., CHANDLER, J.A. Correlation between elemental composition and motility of human spermatozoa. **Fertility Sterility**, v. 28, n. 5, p. 557-61, 1977.

CLULOW, J. R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L. H. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa, **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 298-308, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed. Belo Horizonte. 2013. 104p.

COSTA, D. N. M.; SILVA, D. A. M.; BOAKARI, Y. L.; FERREIRA, S. B.; BRANCO, M. A. C.; SOUZA, J. A. T. Eficiência dos diluidores tris e botu-crio® sobre os parâmetros seminais de garanhões das raças quarto de milha e mangalarga marchador. **Ciencia Animal Brasileira**. v. 15, n. 3, p. 322-329, 2014.

CRABO, B.G., ZIMMERMAN, K. J., MOORE, R., THORNBURGH, F. H. Movements of sodium and potassium into ejaculated boar spermatozoa suspended in seminal plasma and a biological salt solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 444, n. 3, p. 875-85, 1976.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7-11, 1998.

DALY, J. A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the 'CentrifChem'. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 263-265, 1972.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, n. 4, p. 466-470, 1977.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. Comparative assessment of certain biochemical and mineral constituents of seminal plasma and their interrelationships in ox and buffalo bulls. **Liar**, v. 14, n. 2, p. 98-100, 1993.

DHAMI, A. J.; KODAGALI, S. B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen of Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Science**, v. 57, n. 12, p. 1283-1286, 1987.

DOTY, A.; BUHI, W. C.; BENSON, S.; SCOGGIN, K. E.; POZOR, M.; MACPHERSON, M., MUTZ, M.; TROEDSSON, M. H. T. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 157-164, 2011.

EWING, L. L.; CHANG, T. S. K. Physiology of male reproduction. In: WALSH, P. c., GITIES, R. F., PERLMUTIER, A. O. et al. Campbell's urology. Philadelphia:W. B. Saunders, p. 200-74, 1986.

FREITAS, B.; W. **PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E SEMINAIS DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA NO DECORRER DAS ESTAÇÕES CLIMÁTICAS.** 92 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, Minas Gerais, 2010.

GATTI, J-L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J-L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 321-339, 2004.

GEBAUER, M.R.; PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; REMMENG, E.E.; BERNDTSON, W.E. Reproductive physiology of the stallion. VII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. **Journal of Animal Science**. v. 43, p. 626-632, 1976.

GITELMAN, H.J. An improved automatic procedure for the determination of calcium in biologic specimens. **Analytical Biochemistry**, v. 18, p. 521-31, 1967.

HARTWIG, F.P., LISBOA, F.P., MONTEIRO, G.A., MAZIERO, R.R., FREITAS-DELL AQUA, C.P., ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., AND DELL AQUA, J.A. JR. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 340-346, 2013.

HOFFMANN, B.; LANDECK, A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science**. v. 57, p. 89-98, 1999.

JONES, J.M., BAVISTER, B.D. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. **Journal Andrology**, v. 21, n. 5, p. 616-24, 2000.

KORZUN, W.J., MILLER, W.G. Sodium and potassium. In: PESCE, A.J., KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Saint Louis : Mosby, 1987. p .86-91.

KUMAR, S., YING, Y. K., HONG, P., MADDIAH, V. T. Potassium increases intracellular calcium simulating progesterone action in human sperm. **Archives of andrology** v.44, n.2, p.93-101, 2000.

LORENZONI, S.L.G. **Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo.** 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

MANN, C.K., YOE, J.H., **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 202-205, 1956.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C., **Male reproduction and semen**. New York, Springer Verlag, p. 23-28, 1981.

MANN, T.; L-MANN, C. Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids: applications to andrological problems. In: **Male reproductive function and semen**. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin, Springer Verlag, p. 269-336, 1981.

MEDEIROS, A. S. L. Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores. 118f. 2007 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2007.

MEULEMANS, O. Determination of total protein in spinal fluid with sulfosalicylic acid. **Clinica-Chimica**. Acta 5, v. 757, 1960.

MORRELL, J. M.; GEORGAKAS, A.; LUNDEHEIM, N.; NASH, D.; MOREL, M. C. G.; JOHANNISSON, A. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. **Theriogenology**, v. 82, p. 176–183, 2014.

NETO, C. R.; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. A. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 40-43, 2013.

NEUHAUSER, S.; DÖRFEL, S.; HANDLER, J. Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. **Andrology**, v. 3, p. 536- 543, 2015

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of horse**. 6<sup>th</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press, 2007. 360 p.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

RESENDE, H. L.; OLIVEIRA, J. P., ECKER, M. K. C.; GUASTI, P. N.; PAPA, F. O. E JACOB, J. C.F. Criopreservação de sêmen equino previamente refrigerado com e sem plasma seminal por 12 horas\*. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 35, n. 4, p. 306-310, 2013.

ROBLERO, L., GUADARRAMA, A., ORTIZ, M. E., FERNÁNDEZ, E., ZEGERS-HOCHSCHILD, F. High potassium concentration improves the rate of acrossome reaction in human spermatozoa. **Fertility Sterility**, v. 49, n. 4, p. 676-9, 1988.

SABATINI, C.; MARI, G.; MISLEI, B.; LOVE, C. C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F.; ROTA, A. Effect of Post-Thaw Addition of Seminal Plasma on Motility, Viability and Chromatin Integrity of Cryopreserved Donkey Jack (*Equus asinus*)

- Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 989-994, 2014.
- SAMPAIO, B.F.B. **Adição de lipídeos ao diluente de congelação de sêmen de garanhões**. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.
- SCHETTLER G, NÜSSEL E. Cholesterol CHOP-PAP. **Arb Med Loz Med Präv Med**, v. 10, p. 25, 1975.
- SETCHELL, B. P. Male reproduction. In: KING, G. J., NEIMANN- SORE SEN, A., TRIBE, O. E. *World animal science-Reproduction in domesticated animals*. New York: **Elsevier**, p. 83-127, 1993.
- STICH, K.; BRINSKO, S.; THOMPSON, J.; LOVE, C.; MILLER, C.; BLANCHARD, T.; VARNER, D. Stabilization of extragonadal sperm reserves in stallions: application for determination of daily sperm output. **Theriogenology**, v. 58, p. 397-400, 2002.
- SWANSON, E.W.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.10, p. 981-987, 1951.
- TRAVIS, A. J.; JORGEZ, C. J.; MERDIUSHEV, T. et al. Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. **Journal Biology Chemical**, v. 276, p. 7630-7636, 2001.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **SAEG 9.1: Sistema de Análises Estatística**. Viçosa, MG: Fundação Arthur Bernardes, 2007. (CD-ROM).
- WALES, R. G.; WHITE. I. G. Some observations on the chemistry o f dog semen. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 9, p. 69-77, 1965.
- WALES, R. G.; WHITE. I. G. The effect of the ions of the alkali metals magnesium and calcium on dog spermatozoa. **Journal o f Physiology**, v. 142, p. 494-502, 1958.
- WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human. **Journal Andrology**, v. 22, p. 680-695, 2001.
- WITE, R. G. Secreções do órgão reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução animal*. 4 ed. São Paulo: Manole, p. 212-28, 1988.
- WONG, W. Y.; FLIK, G.; GROENEN, M. W. P.; SWINKELS, D. W.; THOMAS, C. M. G.; COPIUS-PEEREBOOM, J. H. J.; MERKUS, H. M. W . M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. The impact of calcium, magnesium, zinc

and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 131-136, 2001.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. **In:** The Physiology of Reproduction. New York: E. Knobil e JD Neil, p. 189-317, 1994.

ZAHN, F. S. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e proteicos do plasma seminal e do soro sanguíneo e das proteínas de membrana espermática e sua correlação com a qualidade do sêmen congelado em garanhões.** 118 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, 2006.

## 4. CAPÍTULO 2

### ABORDAGEM PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR E SUA RELAÇÃO COM A CRIOPRESERVAÇÃO.

**RESUMO:** O presente estudo teve por objetivo avaliar os constituintes proteicos do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador e sua relação com a criopreservação do sêmen. Foram utilizados sete garanhões da raça Mangalarga Marchador hípidos de fertilidade comprovada entre 4 e 15 anos de idade, com 400-500 kg de peso corporal. O sêmen foi colhido de junho a agosto de 2013, totalizando 77 ejaculados. Foram realizadas as análises físicas e morfológicas do sêmen. Os plasmas seminais selecionados para o perfil proteômico foram os correspondentes aos sêmens de maior e menor motilidade espermática no pós-descongelamento. O perfil das proteínas foi avaliado pelo método de eletroforese bidimensional e as análises foram realizadas no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare®). As proteínas foram identificadas por MALDI-TOF/TOF (espectrometria de massa) utilizando o software Mascot Daemon para a busca em banco de dados. O site do UniProt (SWISSPROT, NCBI, Equidae) foi consultado para identificação das proteínas. A validação dos resultados foi realizada pelo programa SCAFOLD. As amostras não validadas pelo SCAFOLD foram analisadas pelo programa FlexAnalysis (BRUKER®) para identificação de espectros de MS2 identificados pelo software Mascot Daemon. Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva e correlações simples de Person. Foi observado diferença significativa em relação à CRISP 3 na baixa congelabilidade e não foram observadas correlações entre a HSP 1, a calicreína e a motilidade pós-descongelamento. Conclui-se que a CRISP3 com baixa massa molecular (22-30 kDa) pode ser utilizada como biomarcador de baixa congelabilidade e que a calicreína e a HSP1 não podem ser utilizadas como marcadores de congelabilidade na raça Mangalarga Marchador.

Palavras-chave: Equinos, Horse seminal protein (HSP), Proteômica, Criopreservação.

### **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the protein constituents of the Mangalarga Marchador stallion and its interaction with cryopreservation. Seven Mangalarga Marchador breed stallions with proven healthy fertility, ageing 4 to 15, weighing 400-500 kg were used. Semen samples were collected from June to August 2013, a total of 77 ejaculations. Physical and morphological semen analysis was performed. Selected seminal plasma for proteomic profile per each animal were on of the highest and lowest motility after thaweing. The profile of the proteins was evaluated by two-dimensional electrophoresis method and analyzes were performed in the ImageMaster 2D Platinum 6.0 software (GE Healthcare®). Proteins were identified by MALDI-TOF / TOF (mass spectrometry) using Mascot Daemon software for searching the data. The database UniProt (SWISSPROT, NCBI, Equidae) was consulted to identify the proteins and the validation of the results was performed by SCAFOLD program. Samples not validated by SCAFOLD software were analyzed by FlexAnalysis software (BRUKER®) to identific MS2 spectra by Mascot Daemon software. Significant differences were observed regarding the CRISP 3 in poor freezability and no correlation between the HSP 1, kallikrein and post-thaw motility. It follows that the CRISP3 low molecular weight (22- 30 kDa) can be used as biomarker low freezability and kallikrein HSP1 and can not be used as markers in freezability Mangalarga Marchador.

Key words: Equine, Horse seminal protein, Proteomics, cryopreservation

## INTRODUÇÃO

O papel dos constituintes do plasma seminal sobre a congelabilidade ainda não foram totalmente elucidados. Relatos na literatura demonstram resultados contraditórios em relação à adição ou não do plasma seminal de animais para a criopreservação. Esses fatos demonstram de forma evidente a influência da composição bioquímica e proteica do plasma seminal sobre a resistência da célula espermática equina durante o processo de criopreservação, incluindo a composição proteica.

Na última década, diversas Associações de Criadores de diferentes raças permitiram a utilização do sêmen congelado, o que estimulou as pesquisas com protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões. Entretanto, estima-se que apenas 30 a 40 % dos garanhões produzam sêmen adequado para a criopreservação. Em algumas raças, como a Mangalarga Marchador, a proporção de animais de sêmen de baixa congelabilidade é maior do que em outras raças (ALVARENGA et al., 2005). Dentre as raças equinas, existem diferenças relativas aos parâmetros reprodutivos, e quando as biotecnologias da reprodução são empregadas, os resultados nem sempre atendem às expectativas como quando se utiliza sêmen refrigerado versus o congelado (GOMES; GOMES, 2009).

O comportamento do sêmen à criopreservação é muito variável entre reprodutores, com resultados em programas de inseminação variando de 32 a 73 % de fertilidade por ciclo. Assim, o sêmen de muitos garanhões não poderia ser utilizado para estes fins (LOOMIS, 2001). Alvarenga et al. (1996) demonstraram haver um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao

processo de criopreservação. Segundo estes autores as raças Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista apresentaram os piores índices de congelabilidade, quando comparadas com as raças de hipismo (Hannoveriano, Holstein e Trackenner) e o Quarto-de-Milha, sendo que estes apresentaram sêmen com bons padrões de motilidade pós-descongelamento.

A composição proteica do plasma seminal sofre variações e pode fornecer importantes informações sobre diferenças na congelabilidade do sêmen dos animais. Pesquisas recentes mostram que as análises proteômicas são hoje uma ferramenta valiosa na determinação da presença de proteínas marcadoras ou no mapeamento de perfil dessas proteínas dentro de grupos de amostras diferentes.

Essas proteínas foram divididas em três famílias, proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISPs), proteínas que contêm o domínio fibronectina tipo II (Fn-II) e proteínas da família das espermedesinas. Os membros da família de proteínas CRISPs parecem estar relacionados com processos de espermiogênese, maturação dos espermatozoides, capacitação espermática e na interação espermatozoides-oócito. As proteínas que contêm o domínio fibronectina tipo II (HSP1/ SP1 e HSP2/ SP2) têm sido associadas à modulação da capacitação espermática (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). E as espermedesinas?? Ficou faltando n sequencia do texto deste pragrafico.

As principais proteínas presentes no plasma seminal foram caracterizadas por Calvete et al. (1994) como proteínas do plasma seminal equino (HSP-1 a HSP-8), e possuem baixa massa molecular (14 a 30 kDa). Com exceção da HSP-4, todas apresentam propriedades de ligação aos espermatozoides. As proteínas HSP-1, HSP-2 e HSP-5 até HSP-8 também

possuem habilidade de ligação com a heparina e estão associadas à superfície espermática, indicando importante papel na fertilização (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

A HSP-4 está associada ao produto do gene semelhante a calcitonina, HSP-5 não pôde ser relacionada com outras proteínas conhecidas; HSP-7 participa da interação dos espermatozoides-zona pelúcida (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

HSP-6 e HSP-8 são diferentes isoformas de uma mesma proteína que pertence à família das calicreínas (TÖPPFER-PETERSEN et al., 2005). As sequências do N-terminal de ambas isoformas mostraram alto grau de homologia com o antígeno prostático humano (PSA), que é o biomarcador mais utilizado para rastreamento de cancer de próstata, em virtude de sua alta sensibilidade, fácil dosagem e baixo custo (SILVA, 2012).

A relação da presença e da concentração de proteínas no plasma seminal com a criopreservação é pouco compreendida na espécie equina, assim o presente estudo teve por objetivo avaliar os constituintes proteicos do plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador e relacioná-los à criopreservação.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Delineamento Experimental**

Foram utilizados sete garanhões da raça Mangalarga Marchador dos quais foram colhidos no mínimo sete ejaculados por animal. A cada ejaculado foram retirados três réplicas de 3 mL de plasma seminal. Para a realização da análise proteômica foram selecionadas as amostras de plasma seminal correspondente aos sêmens de alta e baixa motilidade pós-descongelamento de cada animal perfazendo 14 amostras no total. Projeto aprovado pela comissão de ética, processo nº 103/2013 no dia 18/02/2014.

### **Localização Geográfica**

O experimento foi realizado no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Haras Recreio e Haras Barreiro no município de Viçosa em Minas Gerais, com altitude de 649 m e coordenadas geográficas de 20°45'14'', latitude Sul, e o meridiano de 42°52'54'', longitude Oeste. O clima é considerado tipo tropical de altitude com chuvas durante o verão.

### **Instalações e Manejo dos Animais**

Foram utilizados sete garanhões da raça Mangalarga Marchador hípidos com idades entre quatro e 15 anos, pesando entre 400 e 500 kg de peso corporal. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram alojados em baias individuais (16 a 25 m<sup>2</sup>) e piquetes externos individuais (225m<sup>2</sup>) com capim Coast cross (*cynodon-dactylon* (L.) e Tifton (*Cynodon* spp.). A suplementação alimentar foi oferecida duas vezes ao dia, composta de

ração concentrada, segundo recomendações do National Research Council (2007), constituída por: 130 g/kg de Proteína bruta, 90 g/kg estrato etéreo, 100 g/kg de fibra bruta (com ingestão de aproximadamente 1 % do peso vivo), capim elefante (*Pennisetum purpureum* cv *Cameroon*) com cana (*Saccharum officinarum*) picada (3,5 % + 1 % do peso corporal, respectivamente), sal mineral e água *ad libitum*. O controle parasitológico foi realizado de acordo com o manejo dos Haras. Antes do início do experimento, foi realizado o exame andrológico no sêmen dos animais, sendo considerados aptos ou não à reprodução de acordo com os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para a espécie equina (CBRA, 2013).

As colheitas foram realizadas no período de junho a agosto de 2013. Ao iniciar o estudo, cada reprodutor teve sua reserva espermática extra-gonádica esgotada por colheitas diárias de sêmen por cinco dias consecutivos, seguidos por dois dias de descanso sexual (STICH et al., 2002).

#### **Colheita de Sêmen:**

As colheitas foram realizadas em dias alternados, utilizando fêmeas com cio induzido por 20 mg Cipionato de estradiol (Pfizer®), devidamente contida, utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®) previamente preparada com água a 45 °C. De cada reprodutor foram obtidos no mínimo sete ejaculados para análise dos dados. O ejaculado foi colhido em saco plástico dentro de um copo coletor, sob abrigo de luz e das variações de temperatura. Após a colheita, a fração gelatinosa do ejaculado foi retirada por filtração e a avaliação imediata foi realizada considerando o aspecto, coloração, volume, concentração, motilidade total e vigor espermático. O

volume foi aferido em proveta graduada de 250 mL, previamente aquecida a 37 °C. A motilidade espermática total (0 a 100 %) e o vigor espermático (0 - 5) foram observados em microscópio óptico, com aumento de 200 x, utilizando-se 20 µL de sêmen disposto entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. Uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 950 µL de água destilada para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

### **Congelamento de Sêmen:**

Após as avaliações físicas dos ejaculados, os mesmos foram diluídos com Botu-Semen (Botupharma®) na proporção 1:1 (v:v) e transferidos para tubos Falcon de 15 mL para posterior centrifugação a 600 g por 15 minutos (SAMPAIO, 2012).

Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a concentração do pélete calculada em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração espermática, o pélete foi então ressuspenso e homogeneizado com o diluente Botucrio (Botupharma®) para uma concentração final de 50 milhões de espermatozoides / mL (CLULOW et al., 2008). As amostras foram envasadas em 10 palhetas francesas de 0,5 mL, devidamente identificadas, e então refrigeradas a 5 °C por 20 minutos, conforme Sampaio (2012). Após este período as palhetas foram colocadas em vapor de nitrogênio, a 5 cm do nível da lâmina de nitrogênio líquido, por 15 minutos (LORENZONI, 2010) e posteriormente submersas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico.

### **Descongelamento do Sêmen:**

As palhetas foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos (LORENZONI, 2010) para análise de motilidade espermática total.

### **Colheita e Processamento do Plasma Seminal:**

Após a obtenção dos ejaculados, foram retiradas três amostras de 3 mL de sêmen total, que foram acondicionados em microtubos (Eppendorph®) e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, para estocagem em ultrafreezer a -80 °C. Para a quantificação proteica, as amostras foram centrifugadas a 700 g por 20 minutos a 4 °C para que o plasma seminal fosse separado dos espermatozoides.

### **Proteína Total do Plasma Seminal**

Para a realização da análise proteômica foram selecionadas duas amostras de plasma seminal por animal, correspondente aos sêmens que apresentaram alta e baixa motilidade espermática pós-descongelamento, totalizando 14 amostras, contendo em cada uma 500 µL de plasma seminal dos ejaculados selecionados. As amostras foram submetidas à centrifugação em microcentrífuga resfriada a 10.000 g por 10 minutos, a 4 °C, seguindo-se uma segunda centrifugação na mesma temperatura, a 20.000 g por 30 minutos para a clarificação das amostras.

Para a análise da quantidade de proteína solúvel, foi utilizado o método de Bradford (1976). A curva padrão foi preparada utilizando albumina sérica bovina (BSA). Quantidades conhecidas da proteína padrão (BSA) foram adicionadas a 160 µL do reagente de Bradford a 125 % em poços de uma

microplaca (96 poços) de fundo chato, completando-se para o volume de 200  $\mu$ L, com água Mili-Q. A mistura foi deixada reagir em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida foi realizada a leitura da microplaca a 595 nm. Além das proteínas de concentração previamente conhecida, uma triplicata foi realizada utilizando apenas água destilada (branco). Do resultado obtido, foi feita a média da absorvância das três leituras e subtraída à média da leitura do branco e da leitura da placa vazia. Para a obtenção das concentrações de proteína do plasma seminal, o procedimento foi igual ao da obtenção da curva, sendo o resultado baseado na equação ( $\hat{Y} = 0,102x + 0,071$ ;  $R^2=0,987$ ).

Para determinação de proteínas, o fracionamento das amostras em acetona foi realizado na proporção 1:3 (v:v) por cinco horas a  $-20$  °C. Após a precipitação, as amostras foram ressuspensas primeiramente em 100  $\mu$ L de solução de solubilização, foram retirados 5  $\mu$ L desta solução aos quais foram adicionados 45  $\mu$ L de solução de solubilização, obtendo volume final de 50  $\mu$ L, e a proteína total determinada.

### **Eletroforese Bidimensional**

As amostras foram submetidas ao método de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (Anexo II) para identificação de seu ponto isoelétrico (pI) e sua massa molecular (MM), segundo protocolo do Handbooks (GE Healthcare, 2004). As proteínas foram separadas pelos valores de pI, por focalização isoelétrica, com auxílio do sistema EttanIPGphor (GE Healthcare®), em fitas IPG de 7 cm e gradiente de pH entre 3 e 10. Em cada fita, foram aplicados 120  $\mu$ g de proteína. O volume final de 125  $\mu$ L de amostra foi estabelecido como padrão para todas as fitas, sendo esse volume composto

de: amostra de plasma seminal, solução de reidratação (Anexo I), solução DeStreak e IPG buffer (GE Healthcare®). O volume de amostra foi determinado pela concentração obtida no teste do Bradford e o IPG buffer foi fixado em 2,5 % do volume total, conforme recomendações do fabricante. O volume restante foi composto de 50 % de solução de reidratação e 50 % de DeStreak. As fitas foram deixadas na solução por 12 horas. Em seguida, foi realizada a focalização isoeletrica de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 V por 18h; 2) 500 V em passo único por 1 h; 3) 800 Vh em gradiente até 1.000 V; 4) 16.500 Vh em gradiente até 10.000 V; 5) 27.000 Vh em passo único a 10.000 V. Após a focalização isoeletrica, as tiras foram armazenadas a – 80 °C até o momento da segunda etapa da eletroforese bidimensional.

Previamente à separação por massas, as fitas foram equilibradas em solução de equilíbrio (Anexo I), primeiramente adicionada de 1 % de ditioneitol (DTT) e depois de 2,5 % de iodoacetamida. Em seguida, foram fixadas em gel de poli-acrilamida a 14 % (Anexo II) preparados no dia anterior, para garantir melhor polimerização da acrilamida. Para cada gel, um papel de 5 x 5 mm continha 15 µL do marcador de massa molecular de ampla faixa (Bioad-range, Bio-RAD). As fitas foram então submetidas ao sistema Minigel-TetraCell (Bio-RAD) para separação das proteínas em duas etapas: a primeira em baixa amperagem (10 mA), para que as proteínas fossem forçadas a sair da fita e entrar no gel; a segunda, em alta amperagem (40 mA) para que as proteínas se deslocassem pelo gel. O processo foi realizado a 10 °C para evitar superaquecimento. Quando o corante chegou no limite inferior das placas, o sistema foi desligado e os géis foram colocados em uma solução fixadora (ácido acético 10 % (v:v) e etanol 40 % (v:v)) durante a noite.

## **Coloração das Proteínas e Lavagem dos géis**

Após a fixação as proteínas foram coradas pela técnica do Comassie Coloidal (NEUHOFF et al., 1988), os géis foram lavados com água destilada e estocados em solução de ácido acético a 5 %, até que fossem escaneados com auxílio do equipamento ImageScan (GE Healthcare®) .

## **Aquisição e Análise das Imagens**

As imagens obtidas foram analisadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare®) para determinar a abundância das proteínas presentes nos spots, expressa em pixels. O software criou o histograma em pixels das imagens, definindo a distribuição dos pixels pela intensidade. O histograma determinou a cor ou a intensidade de cinza usada para exibir cada pixel na imagem. A abundância relativa das proteínas dos spots foi expressa como percentagem relativa, considerando 100 % como o total dos spots em pixels dentro de uma área definida (constante para todos os géis). Cada spot de proteína correspondeu a uma percentagem do total. Os spots foram enumerados e os dados foram utilizados para preparar um mapa das proteínas presentes. Spots em géis diferentes foram comparados pela sua massa molecular (MM) e seu ponto isoelétrico (pI) aproximados.

## **Identificação de Proteínas**

Os spots de interesse foram retirados dos géis, transferidos para microtubos pequenos e descorados com solução de acetonitrila 50 % e bicarbonato de amônio 25 mM (pH 8), em três lavagens com 200 µL desta solução. Após a completa descoloração dos géis, a solução foi descartada e os géis sofreram sucessivas lavagens com 200 µL de acetonitrila por cinco

minutos, a acetonitrila foi removida e as amostras foram desidratadas em SpeedVac por cinco minutos.

As amostras foram reduzidas usando 100  $\mu$ L de DTT 65 mM, por 30 minutos a 56 °C, e alquiladas com 100  $\mu$ L de iodoacetamida 200 mM por 30 minutos. Seguindo-se sucessivas lavagens com 200  $\mu$ L de bicarbonato de amônio (Ambic) 100 mM por 10 minutos fazendo uso de vórtex, seguidas de desidratações com 200  $\mu$ L de acetonitrila 100 % (vortex). Na sequência, os géis foram secos no speedVac por cinco minutos.

Os géis foram então tripsinizados com solução contendo 12 ng/ $\mu$ L de tripsina (Sequencing Grade Modified Tripsin (Promega®)), 40 mM Ambic, 10 % de acetonitrila, a 37 °C por 16-24 horas. Os pepitídios foram extraídos com ácido fórmico 5 % e acetonitrila 50 %, a amostra foi seca e ressuspendida em solução matriz ácido  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinâmico, na proporção 1:1 (5 mg de matriz + 250  $\mu$ L de acetonitrila a 100 % + 50  $\mu$ L de TFA 3 % + 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Mili-Q),

As proteínas foram identificadas por espectrometria de massa em equipamento MALDI-TOF/TOF utilizando o software Mascot Daemon para a busca em banco de dados. A base de dados UniProt (SWISSPROT, NCBI, Equidae) foi consultada para identificar as proteínas. A validação dos resultados foi realizada usando-se o SCAFOLD. As amostras não validadas pelo SCAFOLD foram analisadas pelo programa flexAnalysis (BRUKER®) e por sequenciamento “de novo” dos espectros de MS2.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Análises descritivas foram efetuadas para todas as características estudadas. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), e comparação das médias pelo teste F. Análise não paramétrica com teste de Wilcoxon foi realizada para comparações da motilidade espermática entre grupos de congelabilidade, com significância de 5%. Correlações Simples de Person ou de Spearman foram efetuadas entre todas as características estudadas. Análise de regressão foi efetuada para estudar o comportamento da motilidade espermática de acordo com o volume percentual. O programa estatístico utilizado foi o SAEG 9.1 (SAEG/UFV, 2007).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No presente estudo foram observadas prevalência de algumas proteínas tanto nos géis correspondentes aos ejaculados de alta e de baixa motilidade pós-descongelamento, com padrão de distribuição dos spots proteicos nos géis. Correlação de  $r=0,85$  foi observada da motilidade espermática pós-descongelamento com o grupo de ejaculados de alta motilidade pré-congelamento ( $P<0,05$ ). As análises proteômicas foram realizadas considerando cada animal como uma repetição biológica, os grupos dos sete géis de alta e baixa motilidade espermática pós-descongelamento foram comparados e não se verificou diferenças em relação à densidade ópticas para as proteínas HSP1 e calicreína ( $P>0,05$ ), porém houve diferença ( $P<0,05$ ) para as proteínas CRISP3 com valores médios maiores registrados para o grupo de baixa motilidade espermática pós-descongelamento (Tabela 1).

A identificação dos constituintes proteicos do plasma seminal pode ser considerada uma análise diferencial e complementar, que associada aos testes usualmente empregados nas avaliações andrológicas, podem elucidar grande variação individual na congelabilidade do sêmen na espécie equina e ainda podem ser utilizadas como biomarcadores de fertilidade.

Com o intuito de melhorar a motilidade espermática pós-descongelamento e reverter possíveis danos causados à membrana espermática durante o processo de criopreservação, amostras de plasma seminal de animais classificados como “bons congeladores” de sêmen vêm sendo adicionadas a amostras de animais considerados “maus congeladores” (NEUHAUSER et al., 2014; MORRELL et al., 2014; SABATINI et al., 2014; NEUHAUSER et al., 2015). Segundo os autores, há algum componente presente no plasma, talvez de origem proteica, que possa estar relacionado à melhora no processo de criopreservação.

No presente estudo, ao avaliar o perfil protéico do plasma seminal nos géis dos plasmas seminais de sêmens de alta e baixa motilidade pós-descongelamento de cada animal, não foram observados spots diferencialmente expressos, porém foram observadas mudanças de expressão proteica em alguns spots, possivelmente, por mudanças pós traducionais. As 60 amostras analisadas por MS, apresentaram massa molecular variando de 8 a 35 kDa e pI de 3,0 a 10,0 (Tabela 4). Esses dados corroboram os valores descritos em estudos anteriores, que demonstram que as proteínas presentes no plasma seminal equino apresentam baixa massa molecular. Segundo Töpfer-Petersen et al. (2005) as proteínas provenientes do plasma seminal equino apresentam massas entre 14 e 30 kDa. Zahn (2006) também observou

em garanhões de diferentes raças a porção mais expressiva de proteínas na faixa abaixo de 30 kDa.

Em todos os géis analisados (alta e baixa motilidade espermática pós-descongelamento) foram observadas bandas proteicas com alta abundância: spots 9 (29,5 kDa, pI 9,83) 10 (29,2 kDa, pI 10,0), 14 ( 29,9 kDa, pI 9,17), 18 (30,2 kDa, pI 9,53), 24 ( 22,1 kDa, pI 9,28), 26 (22,1 kDa, pI 9,28), 30 (21,9 kDa, 9,73 pI), 30-A (35,0 kDa, pI 8,33), 35 ( 35,6 kDa, pI 9,16) e 39 ( 36,7 kDa, pI 3,98) (Tabela 2), identificadas e validadas pelo SCAfold ou por ferramentas computacionais como CRISP3. Em relação a esta proteína, foram observadas diferenças para o grupo de baixa motilidade espermática pós-descongelamento ( $P < 0,05$ ; tabela 1); correlação entre a motilidade espermática e os grupos de alta e baixa motilidade espermática pós-descongelamento ( $r = -0,99$ ); correlação entre a porcentagem volume dos spots (%V) e os grupos de alta e baixa motilidade espermática pós-descongelamento ( $r = 0,61$ ) e correlação entre a motilidade espermática pós-descongelamento e a porcentagem volume dos spots (%V;  $r = -0,69$ ) com comportamento linear ( $\hat{Y} = 3,5388 - 0,4066 X$ ;  $R^2 = 0,48$ ;  $P < 0,02$ ) onde  $\hat{Y}$  = valor estimado da motilidade espermática pós-descongelamento e  $X$  = volume percentual dos spots.

Segundo Schambony et al. (1998a) a CRISP-3 (HSP-3 horse seminal plasma protein) é a principal proteína do plasma seminal equino. Sua ocorrência não se restringe apenas aos epidídimos, seu gene é predominantemente expresso nas ampolas dos ductos deferentes e ao longo dos órgãos genitais masculinos (e ainda nas glândulas salivares) contribuindo assim, para a alta concentração desta proteína (1 mg/mL) no plasma seminal desta espécie. Quantidades superiores de CRISP3 foram positivamente

relacionadas com a taxa de concepção no primeiro ciclo por Novak et al. (2010) e poderia ser considerado um bom marcador de fertilidade em equinos.

Esta proteína (HSP3) apresenta a particularidade de liberação da membrana plasmática (ao menos parcialmente) por meio de lavado das células espermáticas e por isto foi proposto que poderia possuir alguma função nos órgãos genitais da fêmea (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Para Doty et al. (2011) a CRISP3 participa da remoção dos espermatozoides nos órgãos genitais feminino por meio da regulação da ligação de polimorfonucleares aos espermatozoides. Segundo Magdaleno et al. (1997) a CRISP 3 é constituída por cadeia de polipeptídeo não glicosilado, com massa molecular de  $24,99 \pm 3$  kDa e pl de 8-9, sua concentração em diferentes garanhões pode atingir de 0,3 a 1,3 mg/mL de plasma seminal. A presença desta proteína na região pós acrossomal e na porção média da cabeça de espermatozoides sugere papel importante na fisiologia espermática.

Hamman et al. (2007) em estudo avaliando garanhões Hanoverianos, identificaram 52 novos sítios de polimorfismos da CRISP3. Entretanto, um polimorfismo não sinônimo E208K (mutação que leva à troca de aminoácidos nessa posição de ácido glutâmico para lisina) no gene da CRISP3 foi detectado e associado à fertilidade em garanhões. Animais heterozigotos para este polimorfismo genético obtiveram taxas de prenhez por ciclo, 7 % mais baixas do que animais homozigotos para esta mutação. Possivelmente uma troca não conservativa de ácido glutâmico para lisina nessa região da CRISP-3 pode induzir à alteração de suas propriedades de ligação proteína-proteína, podendo subsequentemente afetar a fertilidade do macho. É possível supor que o polimorfismo entre os genes CRISP-3 no equino pode afetar a função da

proteína. De acordo com os autores, os genes que codificam a proteína CRISP3 são candidatos promissores a indicadores de fertilidade. No presente estudo não foi possível visualizar a substituição do ácido glutâmico para lisina na posição E208K.

Jobim et al. (2003) observaram a presença de CRISP 3 em 70 % dos animais de alta qualidade seminal e a ausência desta proteína nos animais de baixa congelabilidade. No entanto, Zahn (2006) não observou diferenças na quantidade desta proteína entre os grupos de congelabilidade. Entretanto, assim como no trabalho de Jobim et al. (2003), a CRISP3 esteve presente em todos os animais de alta congelabilidade, sendo 62,5 % dos animais de média congelabilidade e 71,4 % dos animais de baixa congelabilidade. Em outro estudo avaliando a congelabilidade de garanhões, Jobim et al. (2011) observaram diferenças quanto a presença de CRISP 3 nos animais de alta congelabilidade, em que a proteína apresentou massa de 80-85 kDa e pI de 7,54. Entretanto, nos animais de baixa congelabilidade esta proteína foi encontrada com massa de 25 kDa e pI 7,54. Esse resultado corrobora com o presente estudo, demonstrando que a CRISP3 com baixa massa molecular (22-30 kDa) estão presentes de forma significativa em animais de baixa motilidade espermática pós-descongelamento. Foram visualizadas algumas modificações no padrão dos spots das CRISP3 demonstrando que esta proteína pode ter sofrido mudanças pós traducionais. Não foram observadas CRISP3 com alta massa molecular, sugestivo de alta congelabilidade como descrito pelos autores acima. Para Magdaleno et al. (1997) as proteínas da família CRISP participam da proteção à célula espermática, o que também justifica no

presente estudo a presença desta proteínas em todos os géis de alta e baixa congelabilidade.

De acordo com Töpfer-Petersen et al. (2005) os membros da CRISP parecem estar envolvidos nos processos de espermiogênese (CRISP2), maturação dos espermatozoides, capacitação espermática (CRISP1) e interação espermatozoides-zona pelúcida (CRISP1), porém, em relação a congelabilidade e mudanças pós traducionais em situações de stress como a criopreservação, pouco foi elucidado.

Os Spots1 (17,2 kDa, pl 8,83), 4A e 4B (25,6 kDa, pl 7,83), 5 (21,1 KDa, pl 4), 6 (18,6 KDa, pl 4), 7 (19 KDa,pl 3), 8 (16,9 kDa, pl 3,48), 11 ( 18,2 kDa, pl 6,6), 12 ( 24,9 kDa, pl 8,95), 13 (28,0 kDa, pl 9,38), 19 (13, 4 kDa, pl 7,2) 20 (37,3 KDa, pl 3), 21 (35,2 KDa, pl 3), 22 (26,9 kDa, pl 3,32), 23 (23,7 kDa, pl 3,43), 27 (21 kDa, pl 4,69), 28 (20,6 kDa, pl 5,51), 31 (22,4 kDa, pl 9,94), 31A (25,2 kDa, pl 3,77), 34 (13,8 kDa, pl 7,74) 36 (15 KDa,pl 7), 38 (18,6 KDa, pl 4,94), 39 (36,7 kDa, pl 3,98), 40 (10,9 kDa, pl 4,78), 41 (21,3 kDa, pl 6,03), 42 (28,5 kDa, pl 8,66), 43 (27 kDa, pl 8,67), 44 (15,4 kDa, pl 7,35), 45 (17,6 kDa, pl 6,16), 46 (20,4 kDa, pl 6,2), 47 (16,2 kDa, pl 5,3), 48 (23,9 kDa, pl 3,49), 49 (17,4 kDa, pl 4,65), 50 (17,2 kDa, pl 4,11), 52 (9,4 kDa, pl 4,3), 53 (16,9 kDa, pl 7,92), 54 (14,9 kDa, pl 3,26), 54-1 (13,8 kDa, pl 3,01) e 56 (8,9 kDa, pl 4) (Tabela 2) foram identificadas e validadas pelo SCAFOLD ou por ferramentas computacionais como HSP1 (SP1) presente em todos os géis analisados. Em relação a HSP1 foi observada apenas correlação entre a motilidade espermática e os grupos de alta e baixa motilidade espermática pós-descongelamento ( $r=-0,88$ ) e não houve correlação da mesma com as demais características estudadas.

Segundo Töpfer-petersen et al. (2005) as HSP1 são as proteínas mais abundantes no plasma seminal equino, correspondendo a 70–80 % do total de proteínas, e são homólogas equinas das principais proteínas de ligação à heparina do bovino (BSP) estando envolvidas na capacitação espermática (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

A grande abundância proteica de HSP1 observada tanto nas amostras de alta congelabilidade quanto nas de baixa congelabilidade do presente estudo, corrobora aos autores citados acima, demonstrando a grande distribuição desta proteína no plasma seminal equino, entretanto, não foram encontradas associações desta proteína com a congelabilidade neste estudo. Para MATTOS et al. (2004) as homólogas a HSP1 (as BSPs) podem conferir maior proteção para as propriedades da membrana espermática durante o processo de congelamento do sêmen na espécie bovina e GREUBE et al. (2004) demonstraram que o padrão de interações das proteínas HSP-1/2 com a membrana plasmática dos espermatozoides é similar ao das BSP-A1/A2 (PDC- 109) o que justificaria a grande abundância destas proteínas no plasma seminal e sugere ainda um caráter de proteção as células espermáticas de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

Nauc e Manjunath (2000) observaram diminuição de 70 – 80 % na concentração das proteínas BSP ligadas à membrana espermática depois da criopreservação do sêmen, demonstrando a ocorrência de modificações na membrana dos espermatozoides durante o congelamento, as quais podem alterar as propriedades da membrana, levando à capacitação prematura dos espermatozoides após o descongelamento. Para estes autores, a maior concentração desta proteína no plasma seminal, como foi observada nas

amostras dos reprodutores de alta e baixa congelabilidade no presente estudo, podem conferir maior preservação das propriedades da membrana espermática durante o processo de congelamento do sêmen, mesmo que não tenha sido observado diferenças no presente estudo.

As bandas proteicas 15 (26,8 kDa, pI 5,55), 16 (29,8 kDa, pI 5,06), 17 (27,4 kDa, pI 5,06), 29 (15,8 kDa, pI 5,56), 32 (27,8 kDa, pI 7,68), 33 (25,1 kDa, pI 7,74) e 37 (24 kDa, pI 6,2) foram identificadas e validadas pelo SCAFFOLD ou por ferramentas computacionais como calicreína 2 (Tabela 2). Em relação a KLK2 não houve diferença dos valores médios obtidos no percentual de volume dos spots nos grupos de alta e baixa motilidade pós-descongelamento ( $P > 0,05$ ; tabela 1) e houve correlação da motilidade espermática com os grupos de alta e baixa motilidade espermática pós-descongelamento ( $r = -0,86$ ) as demais correlações foram consideradas não significativas (%V x motilidade espermática x motilidade espermática pós-descongelamento).

A calicreína específica prostática é membro da família do gene da serina-protease, que foi inicialmente descoberta no sêmen e considerado como marcador sérico de maior utilidade para o diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata (CARVALHO et al., 2002). As serina-proteases purificadas do plasma seminal equino possuem extensa similaridade de sequência com o antígeno prostático específico (PSA) em humanos. A calicreína secretada pela próstata do equino (HPK) aparentemente pode ser considerada similar a PSA humana, porém só que em equinos. A HPK foi purificada de garanhão reprodutivamente ativo e foi reportado que a expressão do mRNA do PSA aumenta com andrógenos. A sequência de aminoácidos da calicreína tem alta

similaridade (58 a 60 %) com o PSA humano, o PSA do macaco-rhesus e com a calicreína prostática humana (hK2) (HENTTU; VIHKO, 1994). Segundo Novak et al. (2010) a calicreína – KLK2 foi negativamente relacionada com a taxa de prenhez.

A calicreína é regulada por andrógenos e secretada pela próstata, a quantidade de antígeno específico da próstata no soro é considerado o melhor marcador para o desenvolvimento de tumores prostáticos (ULMERT et al., 2009). No presente estudo foram observados KLK2 em todas as amostras e nenhum animal do estudo apresentou problemas prostáticos, não houve correlação desta proteína com a motilidade espermática ou alta ou baixa congelabilidade pós- descongelamento ( $P>0,05$ ) demonstrando que a mesma não está relacionada com a congelabilidade em equínos da raça Mangalarga Marchador.

**Tabela 1:** Média e desvio padrão da motilidade e %V das proteínas CRISP 3, HSP1 e KLK2 em alta e baixa congelabilidade no plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

CONGELABILIDADE	MOTILIDADE	%V
----- <b>CRISP3</b> -----		
	-----	
ALTA	80,0 ± 0,0 A	0,44± 0,3 B
BAIXA	14,0 ± 5,6 B	2,85 ± 2,3 A
----- <b>HSP1</b> -----		
	-----	
ALTA	68,7 ± 11,9 A	1,5± 2,4 A
BAIXA	20,4 ± 15,2 B	1,2 ± 2,1 A
----- <b>KLK2</b> -----		
	-----	
ALTA	80,0 ± 0,0 A	1,2± 1,1 A
BAIXA	26,0 ± 19,2 B	1,5 ± 1,9 A

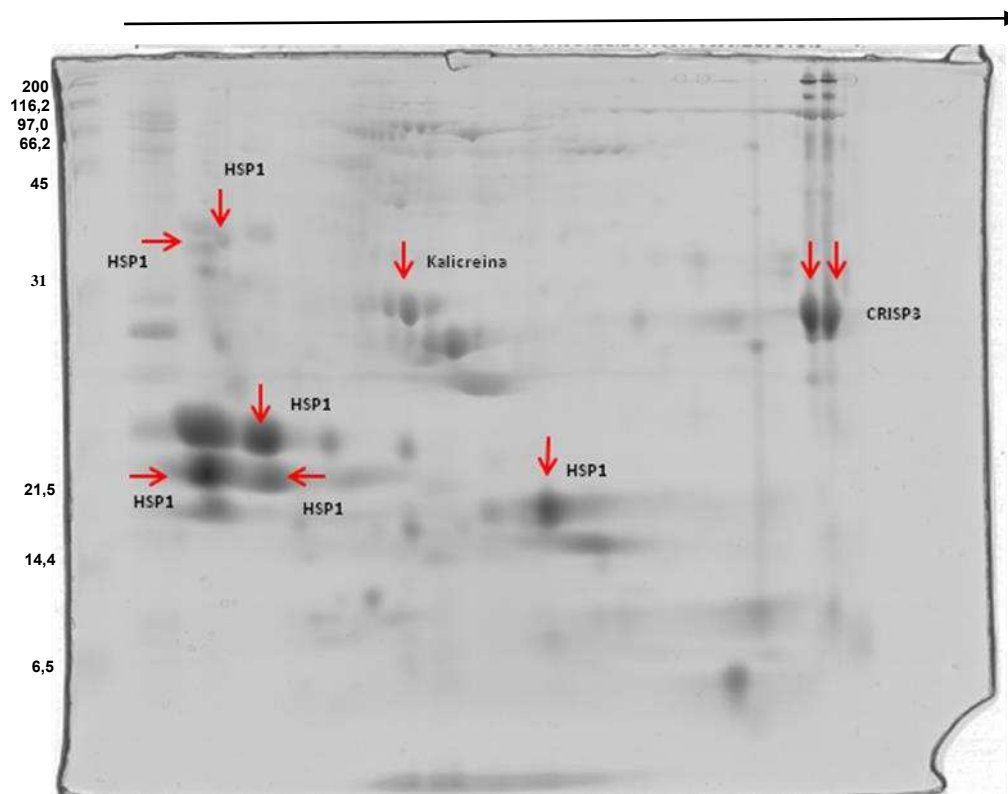
**Tabela 2:** Valores de Motilidade espermática pós-descongelamento (Mot 0), identificação da proteína (Ptn), N° acesso Gi bank, Massa molecular teórica (MWT), Massa molecular experimental (MW E), ponto isoelétrico teórico (pI T) e ponto isoelétrico experimental (pI E) em programa de validação dos dados para plasma seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Spots	Mot 0	Ptn	N° acesso Gi	MW T	MW E	pI T	pI E	Validação
1	80%	HSP1	-	-	17.195		8,83	Ferramentas computacionais
2	80%	-	-	-	18.084		8,18	-
3	5%		-	-	34.316		4,09	-
4A- 4B	80%	HSP1	-	-	25.558		7,83	Ferramentas computacionais
5	80%	HSP1	gi 116802114	14.487	21.185	8,15	4,01	SCAFOLD
6	80%	HSP1	gi 116802114	14.487	18.609	8,15	4,08	SCAFOLD
7	80%	HSP1	gi 194215547	19.871	19.053	7,91	3,4	SCAFOLD
8	80%	HSP1	-	-	16.984		3,48	Ferramentas computacionais
9	10%	CRISP3	gi 3023562	28.172	29.455	7,49	9,83	SCAFOLD
10	10%	CRISP3	gi 6647578	28	29.218		10,0	SCAFOLD
11	10%	HSP1	gi 149722364	18.917	18.202	7,51	6,6	SCAFOLD
12	60%	HSP1	-	-	24.928		8,95	Ferramentas computacionais
13	10%	HSP1	-	-	28.043		9,38	Ferramentas computacionais
14	10%	CRISP3	CRIS3_HORSE	28.202	29.931	7,42	9,17	SCAFOLD
15	40%	KLK2	-	-	26.880		5,55	Ferramentas computacionais
16	40%	KLK2	gi 1263525	29	29.854		5,06	SCAFOLD
17	40%	KLK2	-	-	27.465		5,06	Ferramentas computacionais
18	10%	CRISP3	gi 3023562	28.202	30.206	7,42	9,53	SCAFOLD
19	40%	HSP1	-	-	13.433		7,2	Ferramentas computacionais
20	40%	HSP1	gi 194215547	19	37.301		3,54	SCAFOLD
21	40%	HSP1	gi 194215547	19	35.223		3,36	SCAFOLD
22	40%	HSP1	-	-	26.952		3,32	Ferramentas computacionais
23	40%	HSP1	-	-	23.751		3,43	Ferramentas computacionais
24	20%	CRISP3	-	-	22.095		9,28	Ferramentas computacionais
25	20%	-	-	-	8.159		9,3	-
26	20%	CRISP3	-	-	22.095		9,28	Ferramentas computacionais

<b>27</b>	80%	HSP1	-	-	21.061	4,69	Ferramentas computacionais
<b>28</b>	80%	HSP1	-	-	20.631	5,51	Ferramentas computacionais
<b>29</b>	80%	KLK2	gi 18250639	21927	15.824	5,44	5,56 SCAFFOLD
<b>30</b>	80%	CRISP3	-	-	21.930	9,73	Ferramentas computacionais
<b>30-A</b>	80%	CRISP3	-	-	35.021	8,33	Ferramentas computacionais
<b>31</b>	80%	HSP1	-	-	22.441	9,94	Ferramentas computacionais
<b>31-A</b>	80%	HSP1	-	-	25.245	3,77	Ferramentas computacionais
<b>32</b>	5%	KLK2	-	-	27.868	7,68	Ferramentas computacionais
<b>33</b>	5%	KLK2	-	-	25.190	7,74	Ferramentas computacionais
<b>34</b>	5%	HSP1	-	-	13.898	7,74	Ferramentas computacionais
<b>35</b>	80%	CRISP3	-	-	35.576	9,16	Ferramentas computacionais
<b>36</b>	80%	HSP1	gi 149722364	18	15.095	7,49	SCAFFOLD
<b>37</b>	80%	KLK2	gi 18250639	21.927	24.474	5,44	6,2 SCAFFOLD
<b>38</b>	80%	HSP1	gi 116802114	14	18.664	4,94	SCAFFOLD
<b>39</b>	80%	HSP1/CRISP3	-	-	36.688	3,98	Ferramentas computacionais
<b>40</b>	10%	HSP1	-	-	10.993	4,78	Ferramentas computacionais
<b>41</b>	50%	HSP1	-	-	21.379	6,03	Ferramentas computacionais
<b>42</b>	50%	HSP1	-	-	28.571	8,66	Ferramentas computacionais
<b>43</b>	50%	HSP1	-	-	27.017	8,67	Ferramentas computacionais
<b>44</b>	60%	HSP1	gi 149722364	18	15.357	7,35	SCAFFOLD
<b>45</b>	60%	HSP1	-	-	17.639	6,16	Ferramentas computacionais-
<b>46</b>	60%	HSP1	-	-	20.411	6,2	Ferramentas computacionais
<b>47</b>	60%	HSP1	-	-	16.296	5,3	Ferramentas computacionais
<b>48</b>	60%	HSP1	-	-	23.976	3,49	Ferramentas computacionais
<b>49</b>	60%	HSP1	-	-	17.465	4,65	Ferramentas computacionais
<b>50</b>	60%	HSP1	-	-	17.208	4,11	Ferramentas computacionais
<b>51</b>	60%		-	-	11.642	4,92	-
<b>52</b>	60%	HSP1	-	-	9.413	4,3	Ferramentas

<b>53</b>	10%	HSP1	-	-	16.962	7,92	computacionais Ferramentas computacionais Ferramentas
<b>54</b>	10%	HSP1	-	-	14.909	3,26	computacionais Ferramentas
<b>54-1</b>	10%	HSP1	-	-	13.820	3,01	computacionais Ferramentas
<b>55</b>	10%	CRISP3	-	-	31.000	7,22	computacionais Ferramentas
<b>56</b>	40%	HSP1	-	-	8.990	4	computacionais
<b>57</b>	40%	-	-	-	13.433	7,2	-
<b>58</b>	40%	-	-	-	25.783	8,86	-
<b>59</b>	40%	-	-	-	16.687	8,92	-
<b>60</b>	40%	-	-	-	9.413	4,3	-

As ferramentas computacional utilizada foi o programa FlexAnalysis (BRUKER®) para identificação de espectros de MS2 identificados pelo software Mascot Daemon



**Figura 1.** Gel bidimensional de poliacrilamida eletroforética de proteínas do plasma seminal equino.

### CONCLUSÕES

As CRISPs 3 com baixa massa molecular (22- 30kDa) podem ser utilizadas como indicador de baixa congelabilidade.

HSP1 e caliceína não se mostram eficazes como indicadores de congelabilidade do sêmen.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.105-113, 2005.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breed and spermatic parameters over equine semen freezability. In: Symposium on Stallion Semen, 1996, Amersfoort. Proceedings... Amesterfoort, SSS, p. 82. (Abstract), 1996.

BARROS, L. O.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F. C.; SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P.; CARNEIRO, G. F. Efeito da adição de glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelação do sêmen eqüino. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. v. 65, n. 2, p. 430-438, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 863-873, 1999.

CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Letter**, v. 407, p. 201-6, 1997.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**, v. 310, p. 615-622, 1995.

CALVETE, J. J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 29, p. 411- 426, 1994.

CARVALHO, A. L.; SANZ, L.; BARETTINO, D.; ROMERO, A.; CALVETE, J.J.; ROMÃO, M.J. Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human PSA. **Journal Molecular Biology**, v. 322, p. 325–37, 2002.

CLULOW, J. R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L. H. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 298-308, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed. Belo Horizonte. 2013. 104p.

COSTA, D. N. M.; SILVA, D. A. M.; BOAKARI, Y. L.; FERREIRA, S. B.; BRANCO, M. A. C.; SOUZA, J. A. T. Eficiência dos diluidores tris e botu-crio® sobre os parâmetros seminais de garanhões das raças quarto de milha e mangalarga marchador. **Ciencia Animal Brasileira**. v. 15, n. 3, p. 322-329, 2014.

DOTY, A.; BUHI, W. C.; BENSON, S.; SCOGGIN, K. E.; POZOR, M.; MACPHERSON, M., MUTZ, M.; TROEDSSON, M. H. T. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 157-164, 2011.

EKHALASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction Development**, v. 70, p. 45–57, 2005.

GARCIA, L. A. D. **HSP-1 e HSP-2 no plasma seminal equino: efeitos da sazonalidade na concentração e relação com a fertilidade de garanhões**. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

GREUBE, A.; MULLER, K.; TÖPFER-PETERSEN, E.; HERRMANN, A.; MÜLLER, P. Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: the stallion seminal plasma protein SP-1/2. **Biochemistry**, New York, v. 43, n. 2, p. 464-472, 2004.

HAMANN, H.; JUDE, R.; SIEME H, MERTENS U, TÖPFER-PETERSEN E, DISTL, O.; LEEB, T. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. **Animal Genetics**, v. 38, n. 3, p. 259-264, 2007.

HEALTHCARE, HANDBOOKS from GE. **2-D electrophoresis: Principles and Methods**. 2004.162p.

HENTTU P, VIHKO P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. **Annal Medicine**, v. 26, p. 157– 64, 1994.

JOBIM, M. I. M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R. M.; SIEME, H.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 765-771, 2011.

JOBIM, M.I.M.; SMITT, F.L.; OBERST, E.R.; BRONZATTO, M.; KROTH, E.; SMIDERLE, W.; MATTOS, R.C. Perfil protéico do plasma seminal de

garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 209-211, 2003.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191-200, 2001.

LORENZONI, S.L.G. **Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

MAGDALENO, L.; GASSET, M.; VAREA, J.; SCHAMBONY, A. M.; URBANKE, C.; RAIDÁ, M.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. J. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 420, p. 179–85, 1997.

MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P. BSP A1/A2: A seminal plasma marker of high semen freezability [abstract]. **In: International Congress on Animal Reproduction**, 15, Porto Seguro, Brazil, v. 2, p. 462, 2004.

MORRELL, J. M.; GEORGAKAS, A.; LUNDEHEIM, N.; NASH, D.; MOREL, M. C. G.; JOHANNISSON, A. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. **Theriogenology**, v. 82, p. 176–183, 2014.

MÜLLER, P.; ERLEMANN, K. R.; MULLER, K.; CALVETE, J. J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; MARIENFELD, K.; HERRMANN, A. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. **European Biophysics Journal**, v. 27, p. 33-41, 1998.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.

NEUHAUSER, S.; DÖRFEL, S.; HANDLER, J. Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. **Andrology**, v. 3, p. 536- 543, 2015

NEUHAUSER, S.; DOERFEL, S.; HANDLER, J. Motility of frozen-thawed stallion epididymal sperm after the addition of homologous seminal plasma from stallions with different semen quality. **Reproduction in domestic animals** v. 49, p. 83-84, 2014

NEUHOFF, V. 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**. v. 9, p. 255-262, 1988.

NOVAK, S.; SMITH, T. A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M. K.; FOXCROFT, G. R.; DIXON, W. T. Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, v. 74, p. 956–967, 2010.

REINEKE, A.; HESS, O.; SCHAMBONY, A.; PETRUNKINA, A. M.; BADER, H.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm-associated seminal plasma proteins—a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions? **Pferdeheilkunde**, v. 6, p. 531–537, 1999.

RESENDE, H. L.; OLIVEIRA, J. P., ECKER, M. K. C.; GUASTI, P. N.; PAPA, F. O. E JACOB, J. C.F. Criopreservação de sêmen equino previamente refrigerado com e sem plasma seminal por 12 horas\*. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 35, n. 4, p. 306-310, 2013.

SABATINI, C.; MARI, G.; MISLEI, B.; LOVE, C. C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F.; ROTA, A. Effect of Post-Thaw Addition of Seminal Plasma on Motility, Viability and Chromatin Integrity of Cryopreserved Donkey Jack (*Equus asinus*) Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 989-994, 2014.

SALOIS, D.; MENARD.; M. PAQUETTE, Y.; MANJUNATH, P. complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 288-97, 1999.

SAMPAIO, B.F.B. **Adição de lipídeos ao diluente de congelação de sêmen de garanhões**. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

SCHAMBONY, A.; GENTZEL, M.; WOLFES, H.; RAID, M.; NEUMANN, U.; TÖPFER-PETERSEN, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1387, p. 206–216, 1998a.

SILVA, T. B. **Desenvolvimento e validação de nomogramas para estimativa de risco para câncer de próstata em população brasileira**. 2012. 122 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

STICH, K.; BRINSKO, S.; THOMPSON, J.; LOVE, C.; MILLER, C.; BLANCHARD, T.; VARNER, D. Stabilization of extragonadal sperm reserves in stallions: application for determination of daily sperm output. **Theriogenology**, v. 58, p. 397-400. 2002.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1999.

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

ULMERT, D.; O'BRIEN, M.F.; BJARTELL, A.S.; LILJA, H. Prostate kallikrein markers in diagnosis, risk stratification and prognosis. **Nature Reviews Urology**, v. 6, p. 384 –91, 2009.

ZAHN, F. S. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e proteicos do plasma seminal e do soro sanguíneo e das proteínas de membrana espermática e sua correlação com a qualidade do sêmen congelado em garanhões.** 118 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, 2006.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP3) presentes no plasma seminal em condições de baixa massa molecular (22- 30 kDa) se mostram eficazes como indicadores de baixa congelabilidade. Constituintes bioquímicos (cálcio, colesterol, glicose, magnésio, fósforo, proteína total, potássio e sódio), HSP1 e calicreína, não devem ser utilizados como biomarcadores de congelabilidade na espécie equina.

## ANEXO I

### Solução de Equilíbrio

	<b>Conc. final</b>	<b>Quantidade</b>
Ureia (PM = 60,06)	6 M	72,1 g
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	75 mM	10,0 mL
Glicerol (87%, v/v)	29,3%	69 mL
SDS	2%	4,0 g
Azul de bromofenol 1% (p/v)	0,002%	400 µL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p.*	Para 200 mL

\*Quantidade suficiente para 200 mL

## ANEXO II

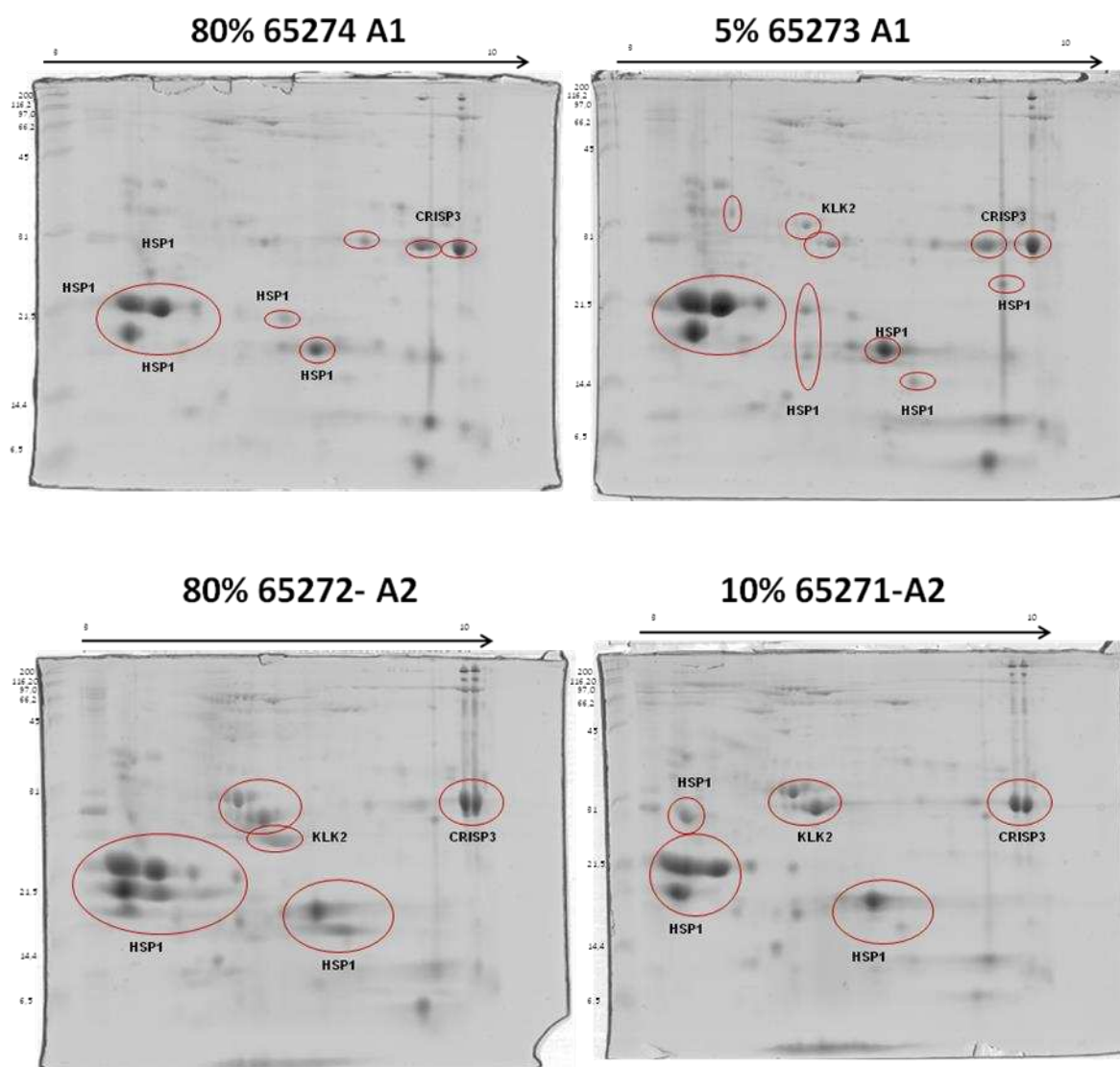
Gel de poliacrilamida de 1,5 mm de espessura e 14 % T para a segunda dimensão da eletroforese bidimensional para uma amostra

<b>Gel 2D (1,0 mm)</b>	<b>14%</b>
Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)	4,67 mL
Tampão Tris-HCl pH 8,8	3,3 mL
SDS 10% (p/V)	1,0 mL
H <sub>2</sub> O deionizada	1,9 mL
* Persulfato de Amônio 10%	120 µL
* TEMED	10 µL

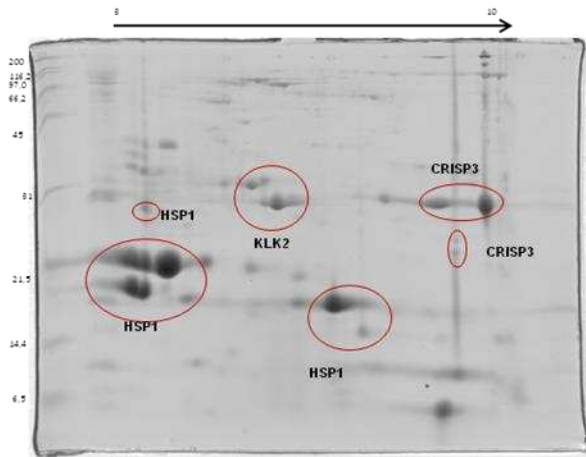
\* Adicionar por último, pois são os catalisadores da reação.

### ANEXO III

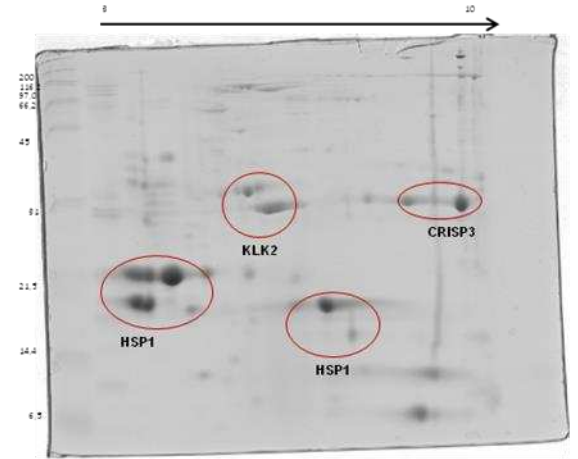
Gel bidimensional de poliacrilamida após separação eletroforética de proteínas do plasma seminal equino de doadores de sêmen classificados como de alta (esquerda) e baixa (direita) congelabilidade dos animais nomeados de A1 a A7.



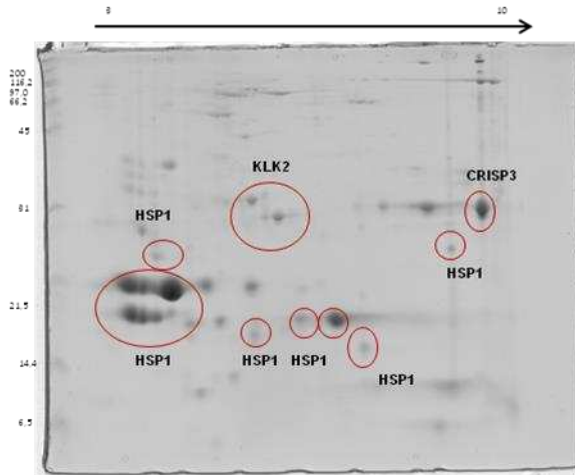
50% 65270 A3



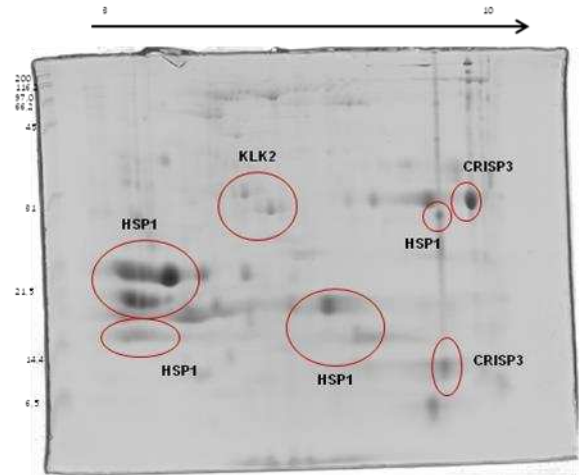
10% 65269 A3



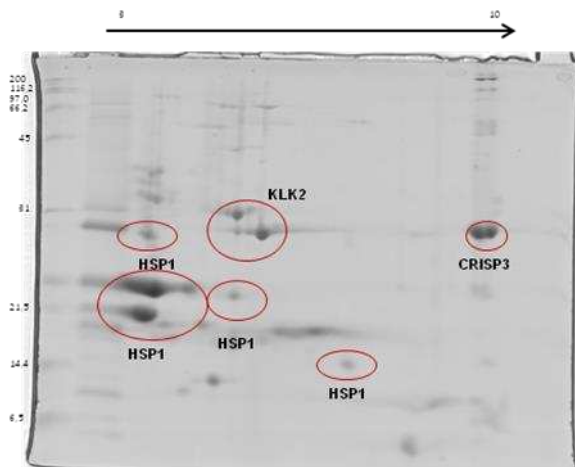
60% 65267 A4



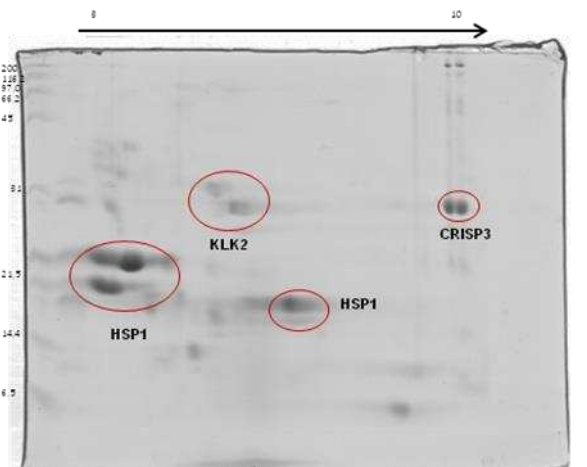
10% 65268 A4



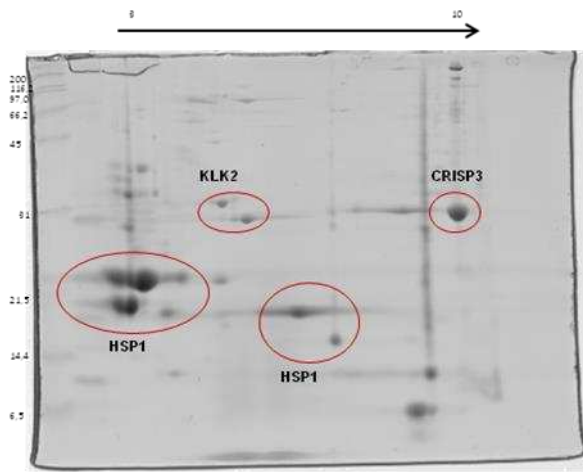
40% 65289 A5



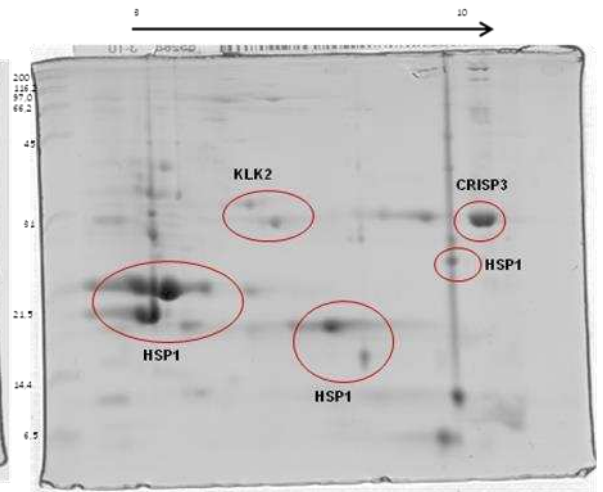
0% 65290 A5



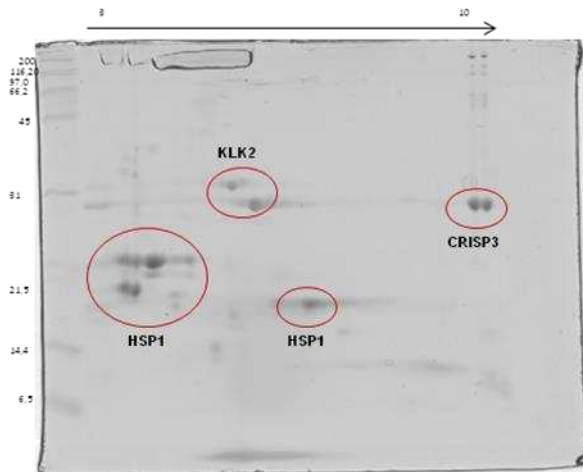
**40% 65287 A6**



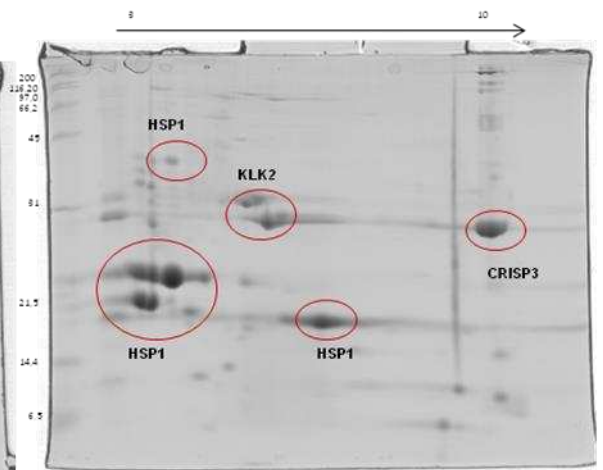
**20% 65288 A6**



**40% 65286 A7**



**10% 65285 A7**



## ANEXO IV

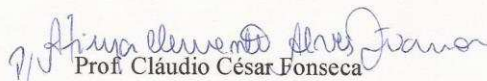
### Parecer de aprovação do Comitê de Ética

#### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 103/2013, intitulado "Perfil bioquímico e proteômico do plasma seminal e sua relação com a criopreservação do sêmen equino", Coordenado pelo professor, José Domingos Guimarães do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 18/02/2014, com validade de 12 meses.

#### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 103/2013, named "Profile and biochemical seminal plasma proteomic and its relationship with cryopreservation equine semen", is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 18, 2014 valid for 12 months.

  
Prof. Cláudio César Fonseca

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV