



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA ANIMAL**

**THALITA MARQUES DE BRITO**

**EFEITO DO DILUIDOR QUIMICAMENTE  
DEFINIDO CONTENDO LDL NA CINEMÁTICA E  
INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES  
REFRIGERADOS DE GARANHÕES MANGALARGA  
MARCHADOR**

**ILHÉUS – BAHIA  
2022**

**THALITA MARQUES DE BRITO**

**EFEITO DO DILUIDOR QUIMICAMENTE  
DEFINIDO CONTENDO LDL NA CINEMÁTICA E  
INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES  
REFRIGERADOS DE GARANHÕES MANGALARGA  
MARCHADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Produção e Comportamento Animal

Reprodução Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Paola P. N. Snoeck

**ILHÉUS – BAHIA**

**2022**

**THALITA MARQUES DE BRITO**

**EFEITO DO DILUIDOR QUIMICAMENTE DEFINIDO CONTENDO  
LDL NA CINEMÁTICA E INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES  
REFRIGERADOS DE GARANHÕES MANGALARGA MARCHADOR**

Ilhéus – BA, 18/03/2022

---

Profa. Dra. Paola Pereira das Neves Snoeck –  
Dsc UESC/DCAA  
(Orientador)

---

Prof. Dra. Yamê Fabres  
Robaina Sancler da Silva –  
Dsc - UFV

---

Profa. Dra. Sandra Cristina Becker Silva  
UESC/DCAA

**ILHÉUS-BAHIA  
2022**

## AGRADECIMENTOS

Nada nessa vida, nada é possível sem o amparo, proteção e benção de Deus, então em primeiro lugar, meus agradecimentos são para Ele.

Com o amparo das forças altíssimas e apegada a ideia de que eu iria conseguir vencer esse desafio, busquei forças em meio a uma pandemia, me vi longe da família e amigos foi muito difícil. Então agradeço a mim por aguentar firme todas as adversidades e desafios que a vida propõe. A minha família, em especial ao meu pai Ita e minha mãe Tina, por serem os meus maiores incentivadores, investidores e fãs. Obrigada por todo apoio e por ser minha base. Obrigada minha mãe por nunca desistir de sua família, por aguentar firme todos os problemas e ser sempre o meu maior acalento. Obrigada meu pai por ser o meu amigo, a muralha que me protege de todos os problemas e por sempre me estender a mão nos momentos mais difíceis. Eu amo vocês!

Ao meu irmão Walker, agradeço por todo apoio, por sempre resolver os meus problemas profissionais mesmo eu estando distante, por todo amor e proteção. A vovó Preta e vovô Branco, pelas orações, pelo carinho e por me receber tão bem na fazenda de vocês, quando tudo estava muito pesado, era no colo de vocês que eu encontrava aconchego e acalento. A vovó Bel e Vovô Toni (*in memoriam*) que cuidam de mim lá de cima, saudades eternas. Aos meus primos, em especial Jardhel e Taiz, aos tios, em especial ao tio Fliudo, agradeço por sempre torcerem e por todo orgulho transmitido.

Aos meus amigos, em especial Andressa, Katharine, Aiala, Raquel, Ana Paula, Joice, Rander, Mon, Jucy, Pam, Rômulo, Rhafisa, Hanna, Selene, Marlon, Leila, Marcinha, por todo apoio, risadas e por fazerem os meus dias menos estressantes. Vocês são as minhas jóias.

A Taise, Zubaria, Bruna, Alda, Karol e Vanessa, por me acolherem tão bem em Ilhéus. Aos funcionários do HV, por toda ajuda e companherismo durante esse período de pandemia, nós fomos vencedores. A equipe GERA, em especial ao doutorando Willan Moraes, por ser meu braço direito durante todo o experimento, pela parceria de sempre, por ser o meu "orientador". A Larissa, Máira e Diego pela ajuda nas coletas, e a professora Paola Snoeck por toda orientação durante esse período. E por fim, mas não menos importante, agradeço aos equinos, sem eles nada disso seria possível. Gratidão.

# **EFEITO DO DILUIDOR QUIMICAMENTE DEFINIDO CONTENDO LDL NA CINEMÁTICA E INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES REFRIGERADOS DE GANHÕES MANGALARGA MARCHADOR**

## **RESUMO**

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são componentes extraídos da gema de ovo e conferem proteção espermática contra o choque frio. O meio desenvolvido por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW), com modificações em sua formulação original, já conseguiu preservar o sêmen equino por até sete dias em temperatura ambiente, sua formulação mantém o metabolismo espermático de forma a garantir a sobrevivência espermática por tempo prolongado. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi utilizar o meio BWW para refrigerar a 15°C o sêmen de ganhões Mangalarga Marchador com a adição de LDL extraídas da gema de ovo. Sete ejaculados de sete ganhões foram coletados por meio de vagina artificial, diluídos e centrifugados. Depois da centrifugação, o pellet foi rediluído para obtenção de 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, formando os grupos experimentais: BotuSêmen®; BWW; BWW suplementado com 2%, 4%, 6%, 8% e 10% da LDL. As amostras diluídas foram submetidas à refrigeração a temperatura de 15°C por 24 horas. Para avaliar o efeito dos diluidores foram avaliados os parâmetros de cinemática espermática pelo SCA Evolution®; a integridade estrutural das membranas (sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP)); a integridade funcional da membrana plasmática (teste hiposmótico (HOST)); a integridade da cromatina espermática (técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina) e a atividade mitocondrial (coloração de 3,3'-diaminobenzidina (DAB)). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso. Os dados foram submetidos Análise de Variância utilizando o software R Core Team, com um nível de significância de 5%. O BWW preservou de forma semelhante ao BotuSêmen® os parâmetros de atividade mitocondrial e ALH. O diluidor BotuSêmen® foi superior nos parâmetros de motilidade, VCL, VSL e BCF. O diluidor BWW com 10% de LDL preservou a VAP semelhante ao BotuSêmen® e os dois foram superiores aos demais diluidores. O teste de HOST foi superior nos diluidores contendo LDL do que no BotuSêmen® e meio BWW. O percentual de estruturalmente íntegros foi maior nas amostras refrigeradas em BWW contendo LDL e BotuSêmen® do que no meio BWW sem LDL. Baseado nos resultados foi possível concluir que o meio BWW sem adição de LDL não pode ser utilizado para refrigerar o sêmen equino e o diluidor BotuSêmen® foi superior aos demais tratamentos, porém o meio BWW + 10% da LDL, foi semelhante ao BotuSêmen® em diversos parâmetros conseguindo manter a cinemática, integridade estrutural e funcional das membranas, compactação do DNA e atividade mitocondrial ideal para refrigerar o de sêmen equino a 15°C.

**Palavras-chave:** BWW; equino; gema; lipoproteínas; refrigeração.

# **EFFECT OF CHEMICALLY DEFINED DILUTER CONTAINING LDL ON THE KINEMATICS AND INTEGRITY OF REFRIGERATED SPERMATOZOIDS IN MANGALARGA MARCHADOR STALLIONS**

## **ABSTRACT**

Low density lipoproteins (LDL) are components extracted from egg yolk and confer sperm protection against cold shock. The medium developed by Biggers, Whitten and Whittingham (BWW), with modifications in its original formulation, has been able to preserve equine semen for up to seven days at room temperature. Therefore, the objective of this study was to use the BWW medium to refrigerate at 15°C the semen of Mangalarga Marchador stallions with the addition of LDL extracted from egg yolk. Seven ejaculates from seven stallions were collected via artificial vagina, diluted and centrifuged. After centrifugation, the pellet was rediluted to obtain 50 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL, forming the experimental groups: BotuSêmen®; BWW; BWW supplemented with 2%, 4%, 6%, 8% and 10% of LDL. The diluted samples were submitted to refrigeration at 15°C for 24 hours. To evaluate the effect of diluents, the parameters of sperm kinematics were evaluated by SCA Evolution®; the structural integrity of the membranes (fluorescent probes carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide (PI)) the functional integrity of the plasma membrane (hypotonic test (HOST)); the integrity of sperm chromatin (metachromasia technique induced by toluidine blue) and mitochondrial activity (3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining). The experimental design was randomized block design. Data were subjected to Analysis of Variance using R Core Team software, with a significance level of 5%. BWW preserved similarly to BotuSêmen® the mitochondrial activity and ALH parameters. BotuSêmen® diluent was superior in the parameters of motility, VCL, VSL and BCF. BWW diluent with 10% LDL preserved the PAV similar to BotuSêmen® and both were superior to the other diluents. The HOST test was higher in diluents containing LDL than in BotuSêmen® and BWW medium. The percentage of structurally intact was higher in the samples chilled in BWW containing LDL and BotuSêmen® than in BWW medium without LDL. Based on the results it was possible to conclude that the BWW medium without addition of LDL cannot be used to cool equine semen and the diluent BotuSêmen® was superior to the other treatments, but the BWW medium + 10% of LDL was similar to BotuSêmen® in several parameters managing to maintain the kinematics, structural and functional integrity of the membranes, DNA compaction and mitochondrial activity ideal to cool equine semen at 15°C.

**Keywords:** BWW; equine; yolk; lipoproteins; refrigeration.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Parâmetros seminais da cinética após de 24 horas de refrigeração .....	47
	..	
<b>Tabela 2 –</b>	Avaliação da integridade estrutural, funcional, morfológica e da cromatina depois de 24 horas de refrigeração a 15C° em diluidores .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	Microlitro(s)
I	Um em algarismo romano
II	Dois em algarismo romano
III	Três em algarismo romano
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$10^6$	Milhões
$P > 0,05$	Probabilidade maior que 5%
®	Registrado
1000x	Aumento de 1000 vezes
400X	Aumento de 400 vezes
7H20	Sulfato de zinco heptahidratado
G	Gramas
Mg	Miligramas
A	Alfa
B	Beta
$\Gamma$	Gama
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\text{m}^2$	Metro quadrado
ABCCM	Associação Brasileira dos criadores de Mangalarga Marchador
ALH	Deslocamento Lateral da Cabeça
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
BCF	Frequência do Batimento Flagelar Cruzado
BSA	Albumina de soro bovino
BSPs	Proteínas do plasma seminal



Ca	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
DAB	Coloração de 3,3'-diaminobenzidina
DAB I	Alta atividade mitocondrial
DAB II	Atividade mitocondrial intermediária
DAB III	Baixa atividade mitocondrial
DAB IV	Atividade mitocondrial inexistente
DAG	1,2-diacil glicerol
D MAI	Espermatozoides apresentando defeitos morfológicos maiores
D MEN	Espermatozoides apresentando defeitos morfológicos menores
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNA C	Cromatina compactada
DPPH	Ensaio 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
FIV	Fertilização in vitro
FRAP	Método de Redução do Ferro
G	Gaus
G	Gramas
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HOST	Teste hiposmótico
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
IP	Iodeto de propídio
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilos
KH <sub>2</sub> P <sub>04</sub>	Fosfato de potássio tribásico

LARA	Laboratório de Reprodução Animal
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LIN	Linearidade
L	Litros
M	Metros
Mg	Micrograma
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MM	Mangalarga Marchador
MP	Motilidade progressiva
mOsmol /L	Miliosmol por litro
MT	Motilidade total
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH 0,1 N	Hidróxido de sódio a 0,1 normal
PBS	Fosfato buferinado salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Peça intermediária
P:p	Peso/peso
PPGCA	Programa de Pós Graduação em Ciência Animal
QM	Quarto de Milha
ROS	Espécies reativas de oxigênio
STR	Retilinearidade
UI	Unidades internacionais
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
V	Vigor

VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade linear progressiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
4.1	Mercado equino brasileiro.....	22
4.2	Meio Biggers, Whitten e Whittingham (BWW).....	22
4.3	Gema de ovo como componente dos diluidores.....	24
4.4	Lipoproteína de baixa densidade (LDL).....	24
4.5	Mecanismo de ação da LDL.....	27
4.6	Uso da LDL em espermatozoides de espécies domésticas e silvestres.....	29
4.7	Refrigeração do sêmen equino.....	31
	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>35</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
6.1	Aspectos éticos.....	40
6.2	Reagentes e soluções.....	40
6.3	Meio BWW.....	40
6.4	Extração da LDL da gema de ovo.....	41
6.5	Local, animais e coleta.....	42
6.6	Processamento do sêmen.....	42
6.7	Cinemática espermática.....	43
6.8	Avaliação da integridade estrutural das membranas.....	43
6.9	Avaliação da integridade funcional das membranas.....	44
6.10	Avaliação da integridade da cromatina espermática.....	44
6.11	Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides.....	45
6.12	Análises estatísticas.....	45
<b>7</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXO 1 - REGRAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são componentes comumente extraídos da gema de ovo e conferem proteção espermática contra o choque frio quando utilizados em diluidores seminais (PACE; GRAHAM, 1974; MOUSSA *et al.*, 2002; SNOECK *et al.*, 2019), porque o mecanismo de ação é baseado na ligação desta com as proteínas do plasma seminal, evitando assim o efluxo, ou por prevenir a perda e/ou garantir a reposição de colesterol e fosfolipídios da membrana, garantindo sua estabilização durante a redução de temperatura, seja pela refrigeração (DALAL *et al.*, 2020) ou congelação do sêmen. As LDL ocasionam proteção mais eficaz dos canais CatSper, que são responsáveis pelo controle de cálcio intracelular e, também possuem uma menor quantidade de progesterona circulante quando comparado a gema de ovo pura, este hormônio responsável também por ativar o canal CatSper. Com isso, existe um maior controle do influxo de cálcio descontrolado para o interior da célula, impedindo então que o espermatozoide inicie mudanças semelhantes a capacitação espermática, antes do processo de fertilização (DALAL *et al.*, 2020). Além disso, as LDL são componentes com potencial antioxidante superior, pois possuem quase o dobro da capacidade de perder hidrogênio quando comparado a gema de ovo. Vale ressaltar que o processo de extração não retira a atividade antioxidante dos diluidores contendo a LDL (DALAL *et al.*, 2020). Por isso, é um componente excelente para ser adicionado nos diluidores seminais de refrigeração e congelação.

O meio desenvolvido por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW) foi criado em 1956 para ser usado como meio de cultura para embriões, este passou por modificações em sua formulação original, mas sua composição base tem o cloreto de sódio (*NaCl*), cloreto de potássio (*KCl*), cálcio (*Ca*), fosfato monopotássico (*KH<sub>2</sub>P04*), sulfato de magnésio (*MgSO<sub>4</sub>*), sulfato de zinco (*ZnSO<sub>4</sub>*), bicarbonato de sódio (*NaHCO<sub>3</sub>*), piruvato, lactato, glicose, albumina sérica bovina, sulfato de estreptomicina, penicilina, sal de potássio e água destilada (WHITTEN; BIGGERS, 1968).

O meio BWW vem se mostrando bastante eficiente em pesquisas realizadas em gametas de diversas espécies como primatas neotropicais (GRABNER, 2016), seres humanos (CALVO *et al.*, 1993), canguru (LIN *et al.*, 2017), gatos domésticos (HOWARD *et al.*, 1990), cães (MAHI; YANAGIMACHI, 1976), e já conseguiu preservar o sêmen equino por até seis dias a uma temperatura de 22°C (SWEGEN *et al.*, 2016).

Apesar do meio não ter sido desenvolvido para preservar os espermatozoides em baixas temperaturas, sua formulação pode ser capaz de manter o metabolismo espermático de

forma a garantir a sobrevivência por tempo prolongado. Por isso, nosso objetivo é adicionar diferentes concentrações da LDL no diluidor BWW, afim de preservar o sêmen refrigerado, de garanhões Mangalarga Marchador a 15° C por até 48 horas, oferecendo uma formulação diluidora que possa ser sanitariamente controlada. Este estudo será pioneiro, tendo em vista que não foi encontrado na literatura até o momento da escrita dessa dissertação, nenhum relato de incorporação de diferentes concentração da LDL ao meio BWW para armazenar espermatozoides equino refrigerados em uma região de clima tropical.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Refrigerar o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador a 15° C utilizando o diluidor BWW com adição de diferentes concentrações de LDL extraída da gema de ovo de galinha.

### **3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Utilizar o diluidor BWW contendo 2%, 4%, 6%, 8% ou 10% de LDL para refrigerar e conservar o sêmen equino a 15°C por até 48 horas, verificando o efeito destes sobre os seguintes parâmetros:

- Cinemática espermática.
- Morfologia espermática.
- Integridade estrutural.
- Integridade funcional.
- Integridade da cromatina.
- Atividade mitocondrial.



## **4 REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 Mercado equino brasileiro**

O mercado equino brasileiro é representado por 5,8 milhões de animais, sendo o maior rebanho na América Latina (ANUALPEC, 2017). A indústria equina mobiliza cerca de 16 bilhões de reais por ano em todo território (MAPA, 2016), contribuindo diretamente para economia brasileira. A raça Mangalarga Marchador possui destaque entre as raças de equino criadas no Brasil, pois sua aptidão natural a marcha rápida e suave é muito apreciada. A Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM) é composta por 18.320 associados e mais de 644.000 animais foram registrados, representando então 29,47% de todo o rebanho nacional (ANUALPEC, 2017). A participação do cavalo Mangalarga Marchador na economia equestre gira em torno de provas, competições, leilões, comércio de potros, matrizes, garanhões, venda de sêmen e embriões. Segundo a ABCCMM, no Brasil, houve cerca de 10.196 transferências de embriões e 8.147 nascimentos de potros com o uso embriões em receptoras da raça, evidenciando assim, um mercado equino e reprodutivo de grande importância e com crescimento expressivo (ANUALPEC, 2017).

Apesar da ascensão desse mercado, essa raça, talvez pela falta de seleção reprodutiva no Brasil, possui alguns fatores limitantes que tornam seu gameta mais sensível e menos tolerante aos processos de criopreservação, com garanhões que manifestam uma diminuição na capacidade de produção espermática, girando em torno de 3 a 5 bilhões de espermatozoides por dia, enquanto equinos das raças Quarto de Milha e de origem germânica produzem até o dobro dessa quantidade. Já se sabe que garanhões Mangalarga Marchador apresentam uma menor resistência a refrigeração e criopresevação espermática devido a um fator racial (GOMES; GOMES, 2009) e também, uma maior sensibilidade dos espermetozoides aos crioprotetores, graças a uma menor resistência osmótica durante a criopreservação (MEDEIROS, 2007). Sendo assim, é necessário estudos e pesquisas, afim de minimizar os problemas apresentados e também maximizar o uso dos gametas desses animais, seja em temperatura ambiente, refrigerado ou congelado, através do desenvolvimento de novos protocolos, diluidores e crioprotetores, que deverão levar a um menor dano celular.

### **4.2 Meio Biggers, Whitten e Whittingham (BWW)**

Existem centenas de protocolos com diferentes diluidores desenvolvidos para manter a viabilidade dos espermatozoides equino. Contudo, para preservar o sêmen na temperatura ambiente por tempo prolongado só é encontrado na literatura a descrição do meio denominado

Biggers, Whitten e Whittingham (BWW). Esse meio quimicamente definido é basicamente uma solução salina balanceada, composta de albumina de soro bovino (BSA) ou álcool polivinílico, suplementado com alguns substratos para gerar energia, como glicose, piruvato, lactato, bicarbonato de sódio. Este foi usado pela primeira vez em 1956 pelo pesquisador W. K. Whitten e, apesar de sua formulação simples e quimicamente definida, conseguiu manter a viabilidade de blástocistos de ratos, no qual, dois anos mais tarde, foram implantados em receptoras e geraram camundongos saudáveis pelos pesquisadores McLaren e J.D. Biggers. Quase dez anos depois, em 1967, os cientistas Whittingham e Biggers utilizaram um meio simples contendo lactato e piruvato para manter a viabilidade de embriões durante o desenvolvimento embrionário até duas células. Por fim, Whitten e Biggers, em 1968, descreveram um meio simples e quimicamente definido, composto por cloreto de sódio ( $NaCl$ ), cloreto de potássio ( $KCl$ ), cálcio ( $Ca$ ), fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ), sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), piruvato, lactato, glicose, albumina bovina cristalina, sulfato de estreptomicina, penicilina, sal de potássio e água destilada, para poder desenvolver células blastocísticas no meio *in vitro*. Esse meio simples e quimicamente definido passou por modificações e aprimoramento, sendo hoje conhecido como meio Biggers, Whitten e Whittingham ou meio BWW (WHITTEN; BIGGERS, 1968).

O meio BWW é utilizado em diversas pesquisas como diluidor controle para realização de testes, como provas osmóticas espermáticas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012), testes envolvendo a peroxidação lipídica do espermatozoide (GHOSH *et al.*, 2019), a atividade mitocondrial espermática (DAVILA *et al.*, 2015). Além disso, pode ser enriquecido com diversas substâncias para melhorar a qualidade dos parâmetros espermáticos, como o piruvato, lactato e glicose já citados (DARR *et al.*, 2016), além de antioxidantes como L-carnitina (GIBB *et al.*, 2015) e demais substância como rosiglitazona (SWEGEN *et al.*, 2016).

Pesquisas feitas em primatas neotropicais (GRABNER, 2016), seres humanos (CALVO *et al.*, 1993), canguru (LIN *et al.*, 2017), gatos domésticos (HOWARD *et al.*, 1990), cães (MAHI; YANAGIMACHI, 1976), equinos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; DAVILA *et al.*, 2015; SWEGEN *et al.*, 2016) demonstraram que o meio BWW é realmente eficaz para manter a cinética e a estrutura espermática em temperatura ambiente por até sete dias. Com isso, utilizaremos em nossa pesquisa, o meio BWW juntamente com uma fonte lipídica para refrigerar o sêmen de equinos da raça MM, que é a LDL, componente utilizado na formulação de diluidores espermáticos, mas que ainda não foi utilizada até o presente momento na refrigeração do sêmen equino.

### 4.3 Gema de ovo como componente dos diluidores

No processo de conservação espermática, diversos ingredientes são utilizados na constituição dos diluidores, como leite integral ou semidesnatado, leite de coco e gema de ovo de galinha. O uso da gema de ovo na criopreservação espermática foi relatada pela primeira em 1940, na preservação do sêmen de touros (PHILLIPS; LARDY, 1940), é um importante aditivo, muito utilizado na criopreservação de sêmen canino pelas centrais de reprodução (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020) e também para refrigeração e congelação de espermatozoides de várias espécies de mamíferos domésticos, como os pequenos ruminantes, equino, suíno, bubalinos e felinos. A gema de ovo protege os espermatozoides contra o choque térmico em baixas temperatura e confere proteção aos espermatozoides durante a refrigeração, congelação e descongelação (KAMPSCHMIDT; MAYER; HERMAN, 1953), agindo diretamente na membrana celular (SALAMON; MAXWELL, 2000), através das substâncias de baixo peso molecular que são as lipoproteínas da gema, existindo fortes evidências de que esses componentes estão envolvidas nesse processo de proteção da membrana espermática (MORENO *et al.*, 2013). Dentre as lipoproteínas da gema de ovo, temos as de alta densidade representadas pelas proteínas  $\alpha$  e  $\beta$  fosvitina,  $\gamma$  livetina e  $\alpha$  e  $\beta$  lipovitelina e as proteínas de baixa densidade compostas por lipoproteínas (MORENO *et al.*, 2013).

Mas, apesar do seu efeito benéfico, a gema de ovo trás em sua composição componentes que podem ser prejudiciais aos espermatozoides, gerando inibição da respiração e diminuição da motilidade espermática devido a presença de grânulos (PACE; GRAHAM, 1974; WATSON; MARTIN, 1975). Além disso, a gema de ovo exerce um efeito anticoncepcional no sistema reprodutor de galinhas (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2012), então seria mais proveitoso retirar esses componentes que trazem malefícios aos espermatozoides e adicionar apenas o agente crioprotetor presente na gema, que são as lipoproteínas de baixa densidade (MOUSSA *et al.*, 2002).

### 4.4 Lipoproteína de baixa densidade (LDL)

As LDL são os principais componentes da gema do ovo, contribuindo com 2/3 da matéria seca da gema (MORENO *et al.*, 2013), são compostas por cerca de 11 a 17% de proteínas e 75% a 89% de lipídeos, sendo estes divididos em triacilglicerol (69%), fosfolipídeos (27%), colesterol e ésteres de colesterol (ANTON; GANDEMER, 1997), possuem duas ou mais cadeias polipeptídicas, com peso molecular entre 15.000 a 130.000 (NAKAMURA; HAYAKAWA; SATO, 1977). Estas estão presentes em forma de micelas

esféricas hidratadas, com diâmetros variando de 11,7 a 48,0 nanômetros de diâmetro, um pH entre 6,3 e 7,5 (WATSON; MARTIN, 1975), apresentando um núcleo composto por triglicerídeos e ésteres de colesterol, rodeado por fosfolipídeos e apoproteínas. O tamanho das LDL pode variar devido a quantidade de lipídeos no interior da molécula e aumento de fosfolipídeos entre as proteínas (NEVES; HENRY, 2012). Quando adicionada ao diluidor, a LDL pode ser a grande responsável pela resistência dos espermatozoides ao choque frio, proporcionando efeito crioprotetor a membrana espermática (PACE; GRAHAM, 1974; MOUSSA *et al.*, 2002; SNOECK *et al.*, 2019).

Em diversas pesquisas onde se comparou diluidores contendo LDL e diluidores contendo gema de ovo pura, foi verificado que a adição da LDL resultou em parâmetros similares ou até superiores em relação a viabilidade espermática. Espermatozoides de touros (VERA-MUNOZ *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2010), cães (VARELA JUNIOR *et al.*, 2009; BENCHARIF *et al.*, 2010), javalis (JIANG *et al.*, 2007) e carneiros (LOAIZA-ECHEVERRI *et al.*, 2015) submetidos ao processo de refrigeração e criopreservação utilizando diluidores contendo LDL na sua formulação obtiveram ótimos resultados em relação a funcionalidade do espermatozoide. Houve melhora significativa da cinética espermática, com aumento da velocidade média do trajeto (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) em diluidores que continham LDL (BENCHARIF *et al.*, 2010). A integridade das estruturas espermáticas como acrossoma intacto, membrana plasmática intacta, integridade do DNA e alta atividade mitocondrial aumentada foram superiores em espermatozoides processados em diluidores contendo LDL quando comparado com diluidores com gema de ovo pura (HU *et al.*, 2010).

O uso da LDL nos diluidores mantém e até aumenta parâmetros cinemáticos e a integridade das estruturas espermáticas, resultando em espermatozoides com melhor qualidade depois de refrigerados ou congelados, com aumento da capacidade fertilizante dessas células até o seu destino final, que possibilita o uso desse material em programas de fertilização *in vitro* (FIV) (AMIRAT *et al.*, 2004), ou *in vivo*, através do uso da inseminação artificial (IA) (VARELA JUNIOR *et al.*, 2009).

A LDL pode ser utilizada de forma natural logo após sua extração, armazenada pura ou diluída com diluidores e conservada em temperaturas de -20 a -80°C em freezers (SNOECK *et al.*, 2017). Outra alternativa seria a liofilização da LDL, seu uso facilitaria o processo de armazenamento, onde não seria necessário o uso de freezers e também a diminuição de contaminação microbiológica. Porém, deve-se atentar ao processo e técnica de liofilização da LDL, pois quando liofilizada pura logo após a sua extração, se mostra incapaz

de manter a função protetora para membrana espermática (MOUSTACAS *et al.*, 2011). Mas quando se faz a liofilização da LDL diluída nos diluidores, o resultado pode ser tão bom quanto o uso da gema de ovo fresca (NEVES; HENRY, 2012). O uso da LDL liofilizada junto ao diluidor e armazenada entre 30 e 120 dias foi capaz de preservar a motilidade de espermatozoides da espécie ovina (SNOECK *et al.*, 2017), então seu uso é sim viável, no entanto, é necessário mais pesquisas na área com uso de sêmen de diferentes espécies (MOUSTACAS *et al.*, 2011).

O uso da LDL em conjunto com demais componentes do diluidor seminal, podem gerar resultados ainda melhores de viabilidade espermática. A interação da LDL com antioxidantes enzimáticos, como a catalase e superóxido dismutase, potencializa a atividade protetora para os espermatozoides (SNOECK *et al.*, 2015). A combinação da LDL e aminoácidos, como a glutamina, melhora a qualidade espermática após a descongelamento (AMIRAT-BRIAND *et al.*, 2009). Além disso, a adição da LDL em diluidores utilizados no processo de vitrificação, pode melhorar os parâmetros espermáticos como motilidade total, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática e integridade da membrana acrossomal (CONSUEGRA *et al.*, 2019).

Apesar de trazer diversos benefícios no processo de refrigeração e congelamento, a LDL pode ser maléfica para os espermatozoides quando a molécula não é incluída de forma adequada como um dos componentes do diluidor seminal. Já foi relatado a presença de grânulos em diluidores contendo LDL por causa de baixa solubilidade da molécula em determinadas composições diluidoras ou por causa de incompatibilidade na diluição junto com outras componentes, o que acarreta prejuízo durante a análise computadorizada de sêmen, já que os grânulos são marcados como célula parada ou morta (SNOECK *et al.*, 2019). Além disso, a presença desses grânulos nos diluidores não é desejável, pois pode gerar uma reação inflamatória no útero de éguas pós-inseminação (CELEGHINI *et al.*, 2017), sendo necessário que o diluidor esteja sem grânulos e límpido.

A LDL é um componente da gema de ovo, sendo um material biológico que pode ser contaminado por microorganismos como *Salmonella* e resultar em contaminação cruzada (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020), por isso, existe um risco sanitário no uso de produtos ou subprodutos de origem animal para confecção de diluidor. Embora, este risco possa ser controlado caso seja utilizado um processo de esterilização. A irradiação gama já foi empregado para o controle sanitário de diluidores contendo LDL atendendo os requisitos de qualidade e biossegurança, embora não seja uma técnica indicada para esterelizar diluidores contendo gema de ovo (PILLET *et al.*, 2011).

A técnica de extração da LDL é delicada e demorada, podendo gerar cerca de 50% de produto final, quando comparada ao produto inicial, ou seja, ao volume total de gema de ovo utilizada. Sua produção em auto escala pode ser complexa, dificultando assim a industrialização e comercialização das lipoproteínas de baixa densidade (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020). Uma das formas de extração é a ultracentrifugação utilizando gradiente de densidade que fornece pureza desse componente (PACE; GRAHAM, 1974; MOUSSA *et al.*, 2002;).

A extração da LDL pode ser feita através da utilização de ovos de até três dias e bem acondicionados, depois realiza-se a separação da gema de ovo da albumina. Inicialmente, é realizada a secagem da gema de ovo com papel filtro para remover impurezas aderidos à membrana vitelina. A gema então é coletada sem a membrana vitelina e armazenada em um recipiente pré-resfriado. O material da gema é diluído com uma solução salina isotônica (p:p), agitada por 1 hora e centrifugada. O sobrenadante que é representando pelo plasma é centrifugado novamente para remoção completa dos grânulos. É adicionado ao plasma sulfato de amônio a 40% (Neves *et al.* 2014), e agitado por 1 hora em temperatura de 4°C, afim de precipitar as livetinas presentes no conteúdo. O pH do plasma deve ser fixado e controlado em 8,7 e a temperatura deve ser mantida sempre a 4 °C. Uma nova centrifugação deve ser feita para separar o sobrenadante do sedimento, este deve ser dialisado por pelo menos 6 horas com água destilada refrigerada para eliminar o sulfato de amônio que foi adicionado anteriormente. Depois da diálise, a solução será novamente centrifugada e o resíduo flutuante é o produto final, a LDL (MOUSSA *et al.*, 2002).

#### **4.5 Mecanismo de ação da LDL**

Por diversos anos, o mecanismo de ação da LDL adicionada aos diluidores seminais para proteção espermática era incerto. Acreditava-se que as lipoproteínas ligavam-se na membrana plasmática do espermatozoide, recompondo os lipídeos perdidos no processo natural de efluxo ou refrigeração e criopreservação, mantendo a estabilidade da membrana espermática e protegendo-a contra o choque frio (GRAHAM; FOOTE, 1987). Outro mecanismo de ação citado, baseava-se na ideia, de que quando a molécula de LDL era submetida ao processo de criopreservação, formava-se um gel pela ação dos componentes da LDL (triglicerídeos, fosfolípedos e proteínas) em torno do espermatozoide, este gel protegia as células contra os cristais de gelo do processo de criopreservação (TSUTSUI, 1988). Outro relato aborda sobre o potencial da LDL de se ligar nas proteínas do plasma seminal (BSPs), evitando o efluxo de colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides que ocorrer

durante a interação espermatozoide e plasma seminal, aumentando a resistência e estabilidade da membrana durante a redução da temperatura que ocorre nos processos de refrigeração e congelamento (MANJUNATH *et al.*, 2002).

No entanto, recentemente com a disponibilidade e uso de técnicas e aparelhos modernos que permitem o estudo mais aprofundado da dinâmica molecular da LDL, alguns pesquisadores forneceram informações sobre um novo mecanismo de ação da LDL sobre os espermatozoides. Na medicina, é sabido que a LDL é um tipo de lipídeo que pode se depositar nas artérias do corpo, levando a uma predisposição a aterosclerose e doenças cardiovasculares. No entanto, no processo de refrigeração e criopreservação espermática, essa propriedade de deposição da LDL é benéfica, dependendo de sua concentração.

A LDL proporciona a inibição da desestabilização da membrana espermática quando submetida a baixas temperaturas, devido a sua deposição sobre a membrana espermática e, através da alta relação colesterol:fosfolipídeo resultante desse processo, as membranas ficam mais protegidas do choque frio. Então Dalal *et al.* (2020) relataram que a LDL previne e/ou repõe a perda de colesterol da membrana espermática durante a refrigeração e criopreservação.

Além disso, a gema de ovo pura, contém lipoproteínas de alta densidade (HDL), que atuam como aceptor, removendo o colesterol responsável pela proteção contra o choque frio e estabilização das membranas espermáticas, isso pode estimular mudanças semelhantes a capacitação espermática, antes do momento adequado. O HDL não está presente nos diluidores a base de LDL, portanto, este efeito malefício seria minimizado (DALAL *et al.*, 2020).

Outro mecanismo de ação se baseia no controle dos canais CatSper. É sabido que durante a refrigeração e criopreservação, as proteínas da membrana espermática são submetidas as injúrias químicas e físicas, o que pode levar a sua desnaturação e degradação, além da perda de colesterol da superfície das células, que também induzem a desnaturação dessas proteínas. Isso resulta em uma maior permeabilidade dos íons para o interior da célula, como o cálcio, mineral fundamental para a capacitação espermática. A proteína CatSper é um canal iônico que controla o influxo de cálcio para o interior dos espermatozoides, quando estes estão diluídos em meio contendo a LDL foi observado o aumento da proteína CatSper-2, ou seja, as membranas espermáticas permaneceram com um canal CatSper mais intacto e conseqüentemente, com uma maior funcionalidade, impedindo o influxo de cálcio descontrolado para o interior da célula, evitando então, que o espermatozoide inicie mudanças semelhantes a capacitação espermática muito antes do processo de fertilização (DALAL *et al.*,

2020).

Outro fator importante é a quantidade de progesterona circulante. Já é sabido que a progesterona presente na gema de ovo pura, ativa o CatSper já citado (LIPAR *et al.*, 1999). Espermatozoides que são expostos a diluidores contendo a LDL apresentaram uma menor concentração dessa progesterona, conseqüentemente uma menor ativação do canal CatSper, resultando em um menor influxo de cálcio intracelular. Já o canal CatSper desnaturado e comprometido, permite um influxo descontrolado de cálcio para o interior da célula, sendo que a presença de alto percentual de progesterona no meio potencializa essa debilidade do canal CatSper, contribuindo então para capacitação espermática prematura (DALAL *et al.*, 2020).

Para confirmar que esses fatores levam à indução da capacitação espermática, foi quantificado o valor da tirosina, um biomarcador final da capacitação nos espermatozoides. Ficou evidenciado que a expressão da tirosina é maior em diluidores a base de gema de ovo pura, do que em diluidores a base de LDL. Isso indica que os diluidores a base de gema ovo pura contribuem em maior proporção para as mudanças semelhantes à capacitação espermática induzida e prematura nos espermatozoides, quando comparados com os diluidores contendo somente a LDL (DALAL *et al.*, 2020).

Como citado anteriormente, o processo de extração da LDL requer uma combinação de precipitação de proteínas pelo sulfato de amônio, diálises de algumas horas e diversas centrifugações. O processo de obtenção da LDL era questionado, pois acreditava-se que todo esse procedimento de extração, levaria a remoção e/ou desnaturação de antioxidantes presentes na LDL, componentes que são essenciais para uma boa refrigeração e criopreservação dos gametas masculinos. Para estimar a atividade antioxidante dos diluidores contendo a LDL, foi utilizado os ensaios 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e método de Redução do Ferro (FRAP), ficando evidente que todo processo de extração, não retira a atividade antioxidante dos diluidores contendo a LDL como macromoléculas para controlar o choque frio. A LDL tem quase o dobro da capacidade de perder hidrogênio, quando comparado a gema de ovo presente nos diluidores seminais (DALAL *et al.*, 2020).

#### **4.6 Uso da LDL em espermatozoides de espécies domésticas e silvestres**

Podemos perceber que a LDL é um aditivo de grande potencial para proteção da membrana espermática no processo de refrigeração e criopreservação. A depender da espécie animal estudada e do tipo de armazenamento e conservação do sêmen (fresco, refrigerado, congelado ou vitrificado), a membrana celular espermática pode precisar de diferentes fontes



e concentrações de lipoproteínas. A razão para a necessidade de uma alta ou baixa concentração da LDL pelas membranas espermáticas, pode ser explicado devido às taxas de colesterol:fosfolipídios das mesmas. Quanto menor a taxa de colesterol:fosfolipídeos da membrana plasmática espermática, maior será a necessidade de maiores concentrações da LDL no diluidor, para prover um mecanismo de proteção celular contra o choque frio (HU *et al.*, 2010) e isso vai variar entre as espécies domésticas e silvestres.

Em búfalos, o uso de 12% da LDL no diluidor de congelação resultou em espermatozoides com motilidade total e progressiva melhor, quando comparado com diluidores com 20% de gema de ovo (DALAL *et al.*, 2020). Em touros (MOUSSA *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2010), ovinos (SNOECK *et al.*, 2017) cães (BENCHARIF *et al.*, 2010), cervo ibérico (MARTÍNEZ-PASTOR *et al.*, 2009), gaial (*Bos frontalis*) (PERUMA *et al.*, 2016), o uso de 8% da LDL levou aos melhores resultados em comparação com outros percentuais da LDL que foram utilizados nos estudos de armazenamento e conservação pelo frio. Em javalis e suínos, o uso da LDL em concentrações entre 4 e 6% (JIANG *et al.*, 2007), em *Agu Pig* o emprego de 9% (YAMAUCHI *et al.*, 2009), em galos a adição de 4% (SHAHVERDI *et al.*, 2015) e em coelhos 10 % (IAFFALDANO *et al.*, 2014) foi a concentração considerada adequada para o armazenamento de espermatozoides e manutenção de características de viabilidade desejáveis para garantir a reprodução.

Em primatas não humanos, o uso de diluidores contendo LDL não resultou em melhoria da motilidade espermática quando comparado com o diluidor com 20% de gema de ovo. Esses achados não estão de acordo com pesquisas anteriores, que relataram sobre a superioridade da LDL sobre a gema de ovo. No entanto, diluidores com concentração entre 6% e 10% de LDL garantiu motilidade espermática semelhante quando comparado com espermatozoides que foram criopreservados com diluidores a base de 20% de gema de ovo (DONG *et al.*, 2011), evidenciando então, que diluidores contendo LDL garantem proteção semelhante ou superior aos diluidores contendo gema de ovo pura, dependendo da espécie, da natureza da membrana plasmática e do percentual de LDL que é introduzida no meio.

Segundo Santiago-Moreno *et al.*, (2012), a gema de ovo, quando adicionada ao diluidor, pode exercer um efeito contraceptivo no sistema reprodutor da galinha e a adição de LDL pode ser uma alternativa para diminuir a baixa fertilidade (SHAHVERDI *et al.*, 2015). Um estudo feito com aves utilizando o diluidor comercial Beltsville puro e também enriquecido com 4% de LDL para a criopreservação de espermatozoides de galos demonstrou que a taxa de fertilidade depois da inseminação artificial (IA) foi até 20% maior nas galinhas que receberam espermatozoides conservados em meio contendo LDL quando comparado com

o diluidor comercial puro (SHAHVERDI *et al.*, 2015). Então, o uso de LDL resulta em melhoria de parâmetros cinemáticos, integridade espermática e potencial fértil dos espermatozoides nessa espécie.

Espermatozoides submetidos a conservação pelo frio em diluidores contendo concentrações muito altas da LDL podem apresentar membrana plasmática e acrossomal menos preservadas e maior porcentagem de anormalidades espermáticas, quando comparado com diluidores contendo concentração ideal de LDL (MORENO *et al.*, 2013). O uso de percentuais de LDL superiores ao considerado ideal e apropriado para determinada espécie pode ser prejudicial aos espermatozoides refrigerados, congelados e descongelados, tendo em vista a menor pressão osmótica deste meio. A quantidade de frutose e sais que estão presentes no diluidor adicionado a LDL, podem ser os motivos das alterações de osmolaridade. Também foi descrito que altas concentrações de LDL podem levar ao aumento de viscosidade do meio, acarretando em maior dificuldade de movimentação dos espermatozoides (SHAHVERDI *et al.*, 2015) e, naqueles com problema de solubilidade, em que é possível verificar presença de partículas em suspensão problemas nas avaliações dos parâmetros cinemáticos (SNOECK *et al.*, 2019).

Estudos com uso da LDL em diluidores para criopreservação e vitrificação do sêmen equino mostraram resultados promissores (MARTIN, 2005; SANTOS, 2007; MORENO *et al.*, 2013). O uso de 8% de LDL em diluidor modificado para criopreservação do sêmen conseguiu substituir o uso da gema de ovo pura nos diluidores seminais de equino de maneira efetiva, protegendo os espermatozoides contra os danos criogênicos (MARTIN, 2005). No entanto, a adição de 10 ou 20% de LDL no diluidor INRA 82 para criopreservar o sêmen de cavalos, foi semelhante ao diluidor contendo gema de ovo em preservar parâmetros espermáticos (SANTOS, 2007). Outro autor relata que a concentração de 2% e 3% de LDL, em INRA 96, com 2,5% de glicerol, resultou em melhores resultados cinemáticos quando comparado com diluidores com gema de ovo no processo de criopreservação (MORENO *et al.*, 2013). A concentração de 0,25% de LDL em meio de vitrificação espermática gerou também melhores parâmetros cinemáticos quando comparado com espermatozoides diluídos em meios sem LDL (CONSUEGRA *et al.*, 2019).

#### **4.7 Refrigeração do sêmen equino**

A raça Mangalarga Marchador apresenta uma menor resistência ao processo de refrigeração e congelamento espermática devido a fatores raciais (GOMES; GOMES, 2009), maior sensibilidade dos espermatozoides aos crioprotetores (MEDEIROS, 2007), além de

uma grande variabilidade intrínseca dos garanhões (GOMES; PATRÃO; GOMES, 2009), o que pode gerar resultados insatisfatórios quando é desejado a maximização do potencial reprodutivo destes garanhões. No entanto, o uso de tecnologias de conservação e armazenamento de sêmen, seja a refrigeração e congelação, são imprescindíveis no processo de melhoramento genético, porque prolongam a vida útil dos espermatozoides (GOMES; PATRÃO; GOMES, 2009) e por isso, modificações na formulação de diluidores, nos protocolos e curvas de refrigeração, além da pesquisa do tipo ideal de meio e protocolo para aquele determinado indivíduo, são necessários no campo para garantir o potencial reprodutivo destes garanhões.

O uso de sêmen equino criopreservado oferece uma maior durabilidade do sêmen, podendo ser preservado por tempo indeterminado. No entanto, quando comparado ao sêmen fresco e refrigerado, o sêmen congelado pode resultar em uma menor fertilidade devido principalmente a danos na estrutura e funcional na membrana espermática (GRAHAM *et al.*, 1992), aumento do estresse osmótico causado pelos crioprotetores durante a congelação (MEDEIROS, 2007), além dos custos com a técnica, equipamentos e mão de obra especializada (GOMES; PATRÃO; GOMES, 2009).

A refrigeração é uma alternativa que pode ser utilizada para manter a viabilidade espermática por até 48 horas e oferece diversas vantagens: a coleta e processamento do sêmen no haras, transporte em caixas térmicas apropriadas, sendo possível minimizar os custos com deslocamento da égua ou do garanhão para reproduzir, além de diminuir a incidência de doenças sexualmente transmissíveis.. O principal interesse de estudos usando essa tecnologia de refrigeração de sêmen é conseguir manter o potencial fertilizante dos espermatozoides por vários dias, possibilitando assim, o transporte do mesmo por distâncias maiores (GOMES; PATRÃO; GOMES, 2009).

Alguns fatores podem interferir diretamente na viabilidade do sêmen refrigerado, como a individualidade de cada garanhão e da égua a ser inseminada, a composição e concentração dos diluidores (NASCIMENTO *et al.*, 2015), quantidade de plasma seminal, curva de refrigeração, dose inseminante e tempo de armazenamento *in vitro* (JASKO *et al.*, 1991).

O plasma seminal é um elemento biológico do ejaculado, possui componentes essenciais para o transporte e nutrição espermática, porém no processo de armazenamento e refrigeração, esse componente pode ser deletério aos espermatozoides, a depender da individualidade de determinados garanhões e da composição dessa fração do sêmen. Estudos informam que concentração de 5% de plasma seminal é suficiente para manter a motilidade

do sêmen refrigerado, podendo melhorar a qualidade espermática quando comparado ao uso do ejaculado total, mas essa concentração ideal pode variar entre garanhões (JASKO *et al.*, 1991). Alternativas para diminuir o efeito deletério do plasma seminal são: centrifugação do ejaculado com força centrífuga e tempo adequados; colheita e diluição da fração rica em espermatozoides e utilizar altas taxas de diluição do ejaculado (GOMES; PATRÃO; GOMES, 2009).

A manutenção do sêmen refrigerado visa preservar o espermatozoide com a diminuição da atividade metabólica e redução da atividade microbiana. A cada 10° C de queda da temperatura, ocorre redução do metabolismo celular em até 50% (RAPHAEL, 2007), permitindo a estocagem do material por períodos de 24 a 48 horas, ou mais e manutenção de viabilidade quando ocorre diluição adequada entre  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL e  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL (RAPHAEL, 2007), quando a diluição usa meios que forneçam nutrientes essenciais para o metabolismo espermático, tampões para manter o pH, antibióticos para prevenir contaminação bacteriana durante a estocagem e proteção contra o choque frio. Os padrões mínimos estipulados para refrigeração de um ejaculado são: concentração superior a  $60 \times 10^6$  espermatozoides/mL e mínimo de 40% de motilidade progressiva depois da diluição (JASKO *et al.*, 1991). As temperaturas de 5°C e 15°C de armazenamento final dos espermatozoides equino são bastante utilizadas, contudo, dependendo da temperatura escolhida pode ocorrer diminuição no tempo de vida útil dos espermatozoides (FARRÁS *et al.*, 2014).

A taxa de refrigeração deve ser controlada durante todo o processo para que não haja mudança na temperatura de armazenamento. O sêmen pode ser resfriado rapidamente em 0,7° C/minuto de 37 a 19°C. Entre 19°C e 8°C, a curva de refrigeração deve ser lenta de 0,05° C/minuto, evitando malefícios em decorrência da sensibilidade espermática ao choque frio. Depois de atingida a temperatura de 8° C, a refrigeração pode ser rápida, até a 5°C, quando o espermatozoide pode ficar armazenado por até 48 horas (MORAN *et al.*, 1992).

A refrigeração acarreta diversas mudanças nos espermatozoides, tendo em vista que a redução de temperatura afeta a fluidez da membrana e causa modificação de componentes lipídicos da mesma. Quando essa célula é submetida a temperatura de 22°C, os lipídios permanecem na fase líquida, no entanto, na temperatura de 4°C ocorre mudança de fase para gel (RAPHAEL, 2007).

Essas mudanças física de fase fluída-cristalina para gel, desrespeitam as características normais de fluidez e natureza da membrana plasmática, alterando sua permeabilidade seletiva

e causando mudanças estruturais e funcionais permanente (RAPHAEL, 2007). Além disso, no processo de refrigeração, ocorre perda de colesterol e ácidos graxos poli-insaturados da membrana plásmática, que levará a fosforilação da tirosina. Esse evento pode levar ao aumento da permeabilidade da membrana, contribuindo para um maior influxo de cálcio, ativação da adenilato ciclase e crescimento da produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e 1,2-diacil glicerol (DAG), sendo que todo esse processo resulta na capacitação espermática prematura antes do momento desejável. Por fim, as injúrias geradas pelas baixas temperaturas podem acarretar uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando também fosforilação da tirosina que vai levar a capacitação espermática prematura e aumento do estresse oxidativo dos espermatozoides que passaram pelo processo de refrigeração (NARESH; ATREJA, 2015).

## **ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados obtidos serão apresentados em forma de artigo científico, o qual será submetido ao periódico *Journal of Equine Veterinary Science*. Desta forma, a formatação do manuscrito aqui apresentado, seguirá as normas do periódico, exceto as citações e referências bibliográficas, que foram adequadas de acordo ao PPGCA.

**Artigo Original****EFEITO DO DILUIDOR QUIMICAMENTE DEFINIDO CONTENDO  
LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE NA CINEMÁTICA E  
INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES REFRIGERADOS DE  
GARANHÕES MANGALARGA MARCHADOR**

Thalita Marques de Brito<sup>1</sup>, Willian Morais Machado<sup>1</sup>, Larissa Rodrigues Santana<sup>1</sup>, Maíra  
Guimarães Kersul<sup>1</sup>, Ivan Bezerra Allaman<sup>2</sup>, Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Universidade Estadual de Santa Cruz  
(UESC), Ilhéus-Bahia, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz  
(UESC), Ilhéus-Bahia, Brasil.

Autor correspondente: Thalita Marques de Brito

E-mail: thalitamarquesvet@gmail.com

Endereço postal completo: Rua Ramiro Rocha, nº 135, centro, Jucuruçu, Bahia, CEP 45834-  
000

**RESUMO**

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são componentes comumente extraídos da gema de ovo e conferem proteção espermática contra o choque frio e potencial antioxidante superior a gema de ovo quando presentes em diluidores seminais. O meio desenvolvido por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW), com modificações em sua formulação original, já conseguiu preservar o sêmen equino por até sete dias em temperatura ambiente, sua pode manter mantém o metabolismo espermático de forma a garantir a sobrevivência espermática por tempo prolongado. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi utilizar o meio BWW para refrigerar a 15 °C o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador com a adição da LDL extraídas da gema de ovo. Sete ejaculados de sete garanhões foram coletados por meio de vagina artificial, diluídos 1:2 em BotuSêmen® para centrifugação a 600g por 10 min. Depois da centrifugação, o pellet foi rediluído para obtenção de  $50 \times 10^6$  espermatozoides / mL nos diferentes diluidores, formando os seguintes grupos experimentais: 1) BotuSêmen®; 2) BWW; 3) BWW + 2% LDL; 4) BWW + 4% LDL; 5) BWW + 6% LDL; 6) BWW + 8% e 7) BWW + 10% LDL. As amostras diluídas foram submetidas à refrigeração em 15 °C por 24 horas. Para avaliar o efeito dos diluidores sobre os espermatozoides foram estudados os parâmetros de cinemática espermática pelo SCA Evolution®; a integridade funcional da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST); a integridade estrutural das membranas por meio das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP); a integridade da cromatina espermática utilizando a técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina e a atividade mitocondrial por meio da coloração de 3,3'- diaminobenzidina (DAB). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, dados submetidos Análise de Variância. Todas as análises foram feitas utilizando o software R Core Team, nível de significância de 5%. O BWW só conseguiu preservar de forma semelhante ao BotuSêmen® os parâmetros de atividade mitocondrial e ALH ( $P > 0,05$ ), por isso, não deve ser utilizado para refrigeração de sêmen equino. O diluidor BotuSêmen® foi superior aos demais testados para preservar os parâmetros de motilidade, VCL, VSL e BCF ( $P < 0,05$ ). O diluidor BWW com 10% de LDL preservou a VAP semelhante ao BotuSêmen® ( $P > 0,05$ ) e os dois foram superiores aos demais diluidores ( $P < 0,05$ ). A integridade funcional dos espermatozoides foi mais bem preservada nos diluidores contendo LDL do que no BotuSêmen® e meio BWW ( $P < 0,05$ ). O percentual de estruturalmente íntegros foi maior nas amostras refrigeradas em BWW contendo LDL e BotuSêmen® do que no meio BWW sem LDL ( $P < 0,05$ ). Baseado nos resultados, foi possível concluir que o meio BWW sem adição da LDL não pode ser utilizado para refrigerar o sêmen equino, podendo ser pela ausência de uma fonte lipídica que é capaz de prover proteção contra o choque frio aos espermatozoides. O diluidor BotuSêmen®, foi superior para preservar parâmetros cinemáticos importantes, porém o diluidor composto do meio BWW +10% foi semelhante ao BotuSêmen® em vários pontos, e conseguiu preservar de maneira eficiente, todos os parâmetros realizados, portanto, pode ser utilizado como diluidor para refrigerar sêmen equino a 15 °C.

**Palavras-chave:** BWW; Equino; Gema; Liproteínas; Refrigeração.



## 98 5 INTRODUÇÃO

99 O Mangalarga Marchador (MM) possui destaque entre as raças de equinos presentes  
100 no Brasil, devido a sua aptidão natural a marcha rápida e suave (ANUALPEC, 2017), porém  
101 está raça possui algumas limitações para uso dos gametas, pois apresenta ganhões que  
102 manifestam uma diminuição na capacidade de produção espermática, uma maior sensibilidade  
103 dos espermetaozoides aos crioprotetores, graças a uma menor resistência osmótica durante a  
104 criopreservação (MEDEIROS, 2007) e apresentam uma menor resistência a refrigeração e  
105 congelaçãoespermática (GOMES; GOMES, 2009). Com isso, é necessário o desenvolvimento  
106 de novas técnicas de processamento do sêmen e diluidores, afim de minimizar os problemas  
107 apresentados e também maximizar o uso dos gametas desses animais fresco, refrigerado ou  
108 congelado, que acarretem um menor dano aos espermatozoides.

109 O meio descrito por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW) foi desenvolvido em  
110 1956 para meio de cultura de embriões, passou por algumas modificações em sua formulação  
111 original, sendo composto por cloreto de sódio (*NaCl*), cloreto de potássio (*KCl*), cálcio (*Ca*),  
112 fosfato monopotássico (*KH<sub>2</sub>P04*), sulfato de magnésio (*MgSO<sub>4</sub>*), sulfato de zinco hepta  
113 hidratado, bicarbonato de sódio (*NaHCO<sub>3</sub>*), piruvato, lactato, glicose, albumina sérica bovina,  
114 sulfato de estreptomicina, penicilina, sal de potássio e água destilada (WHITTEN; BIGGERS,  
115 1968).

116 O meio BWW vem se mostrando bastante eficiente para preservar células gaméticas  
117 de diversas espécies como primatas neotropicais (GRABNER, 2016), seres humanos  
118 (CALVO *et al.*, 1993), canguru (LIN *et al.*, 2017), gatos domésticos (HOWARD *et al.*, 1990),  
119 cães (MAHI; YANAGIMACHI, 1976) e já conseguiu preservar o sêmen equino por até seis  
120 dias em temperatura de 22°C (SWEGEN *et al.*, 2016). Apesar do meio não ter sido  
121 desenvolvido para preservar os espermatozoides em baixas temperaturas, sua formulação pode  
122 manter o metabolismo espermático de forma a garantir a sobrevivência espermática por tempo  
123 prolongado.

124 As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são componentes comumente extraídos da  
125 gema de ovo e conferem proteção espermática contra o choque frio (MOUSSA *et al.*, 2002;  
126 SNOECK *et al.*, 2019; BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020). As LDL contribuem em  
127 cerca com 2/3 da matéria seca da gema do ovo (MORENO *et al.*, 2013), são compostas por  
128 cerca de 11 a 17% de proteínas e 75% a 89% de lipídeos, sendo estes divididos em  
129 triacilglicerol (69%), fosfolipídeos (27%), colesterol e ésteres de colesterol (ANTON;  
130 GANDEMER, 1997). Possui duas ou mais cadeias polipeptídicas, com peso molecular entre  
131 15.000 a 130.000 (NAKAMURA; HAYAKAWA; SATO, 1977). Estas estão presentes em

132 forma de micelas esféricas hidratadas, com diâmetros variando de 11,7 a 48,0 nanômetros de  
133 diâmetro, com pH entre 6,3 e 7,5 (WATSON; MARTIN, 1975), apresentando um núcleo  
134 composto por triglicerídeos e ésteres de colesterol, rodeado por fosfolipídeos e apoproteínas.  
135 O tamanho das LDL pode variar devido a quantidade de lipídeos no interior da molécula e  
136 aumento de fosfolipídeos entre as proteínas (NEVES; HENRY, 2012).

137 O mecanismo de ação da LDL se baseia na ligação com proteínas do plasma seminal,  
138 evitando o efluxo, prevenindo e/ou repondo o colesterol e fosfolipídios da membrana,  
139 garantindo a estabilização da mesma durante a redução de temperatura que ocorre na  
140 refrigeração do sêmen (DALAL *et al.*, 2020).

141 A LDL protege com mais eficácia os canais CatSper, que são responsáveis pelo  
142 controle de cálcio intracelular, além de possuir uma menor quantidade de progesterona  
143 circulante, responsável também por ativar esse mesmo canal. Com isso, existe um maior  
144 controle do influxo de cálcio descontrolado para o interior da célula, impedindo então, que o  
145 espermatazoide inicie mudanças semelhantes a capacitação espermática muito antes da  
146 fertilização (DALAL *et al.*, 2020).

147 Além disso, as LDL são componentes com potencial antioxidante superior, possui  
148 quase o dobro da capacidade de perder hidrogênio, quando comparado a gema de ovo presente  
149 nos diluidores seminais. O processo de extração, não retira a atividade antioxidante dos  
150 diluidores contendo LDL (DALAL *et al.*, 2020). Então a LDL pode ser um excelente  
151 componente de diluidores de refrigeração e congelamento do sêmen.

152 Alguns estudos compararam diluidores contendo LDL e diluidores contendo gema de  
153 ovo pura, e foi relatado que a adição de LDL resultou em parâmetros similares ou até  
154 superiores, em relação a viabilidade espermática. Espermatozoides de touros (MOUSSA *et al.*,  
155 2002; HU *et al.*, 2010), ovinos (SNOECK *et al.*, 2017) cães (BENCHARIF *et al.*, 2010),  
156 cervo ibérico (MARTÍNEZ-PASTOR *et al.*, 2009), *gaial* (*Bos frontalis*) (PERUMA *et al.*,  
157 2016) e foram submetidos ao processo de refrigeração e criopreservação utilizando diluidores  
158 com adição de LDL obtiveram ótimos resultados em relação a estrutura espermática,  
159 comparado com diluidores com gema de ovo. Porém, na reprodução equina, o uso de LDL  
160 tem apresentado resultados bons ou ruins. Segundo Martin (2005) a adição de 8% de LDL em  
161 um diluidor modificado para criopreservação de espermatozoides equino conseguiu proteger  
162 de maneira mais eficiente contra os danos causados pela baixa temperatura e substituir a gema  
163 de ovo. O uso de 10% de LDL em diluidor BotuCrio<sup>®</sup> resultou em espermatozoides com  
164 percentual de motilidade semelhante ao diluidor comercial, mas resultou em redução de  
165 velocidade espermática e integridade funcional (SNOECK *et al.*, 2019). No entanto, a adição

166 de 10 ou 20% de LDL em diluidor INRA 82 foi semelhante ao uso do meio contendo gema de  
167 ovo (SANTOS, 2007). Outro autor relata que a concentração de 2% e 3% de LDL em INRA  
168 96, com 2,5% de glicerol, gerou melhores resultados de cinemática espermática quando  
169 comparado com o diluidor contendo gema de ovo (MORENO *et al.*, 2013). No processo de  
170 vitrificação espermática, a concentração de 0,25% de LDL adicionada ao diluidor resultou em  
171 incremento de cinemática espermática quando comparado com os sem LDL (CONSUEGRA  
172 *et al.*, 2019).

173 No entanto o uso da LDL em diluidor BWW para refrigeração de sêmen equino ainda  
174 não foi estudada, e a concentração ideal da LDL em diluidores de sêmen equino ainda é  
175 controversa de acordo a literatura. Com isso, o objetivo do trabalho foi usar a LDL em  
176 concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% ou 10% como uma fonte de lipoproteínas no meio BWW  
177 para refrigerar o sêmen de equino da raça Mangalarga Marchador (MM) a uma temperatura de  
178 15°C, avaliando seu efeito na cinemática dos espermatozoides, integridade estutural e  
179 funcional das membranas, integridade do DNA e atividade mitocondrial

180

## 181 **6 MATERIAL E MÉTODOS**

### 182 **6.1 Aspectos éticos**

183 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEUA/UESC  
184 da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil com o número de protocolo  
185 004/16.

186

### 187 **6.2 Reagentes e soluções**

188 Todos os reagentes utilizados foram puros para análise e adquiridos da empresa  
189 SigmaAldrich® (St. Louis, MO, USA). O meio BWW foi confeccionado no LARA. A LDL  
190 foi extraída da gema de ovo de galinha de acordo com o protocolo descrito por Moussa *et al.*  
191 (2002) com modificações citadas por Neves *et al.* (2014) e depois adicionada ao meio BWW  
192 em diferentes concentrações.

193

### 194 **6.3 Meio BWW**

195 O meio BWW (WHITTEN; BIGGERS, 1968) modificado (GIBB *et al.*, 2015) foi  
196 confeccionado no LARA no mesmo dia da extração da LDL. A confecção do meio é feito em  
197 duas fases, sendo que a primeira fase é a confecção da solução estoque, que é composta por 95  
198 mM cloreto de sódio (*NaCl*), 4,7 mM cloreto de potássio (*KCl*), 1,7 mM cloreto de cálcio  
199 (*CaCl2*), 1,2 mM fosfato de potássio tribásico (*KH2 PO4*), 1,2 mM sulfato de magnésio

200 heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) e água ultra-pura. Os ingredientes são homegenizados e  
201 filtrados com filtros de 0,22  $\mu m$  de espessura da empresa Millex-GP<sup>®</sup>. Depois é confeccionada  
202 a solução de trabalho, composta de 25 mM bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), 5,6 mM de D-  
203 glicose, 275  $\mu M$  de piruvato de sódio, 3,7  $\mu L/mL$  de lactato de sódio 60%, 50 U/mL de  
204 penicilina, 50  $\mu g/mL$  de estreptomicina, 250  $\mu g/mL$  de gentamicina, 20 mM de HEPES e 0,1%  
205 álcool polivinílico. A solução de estoque então é misturada com solução de trabalho. A  
206 osmolalidade final deve ser de aproximadamente 300 mOsmol/L e pH de aproximadamente  
207 de 7,2.

208

#### 209 **6.4 Extração da LDL da gema de ovo**

210 Para a obtenção da gema de ovo de galinha, ovos frescos ou com no máximo dois  
211 dias foram coletados de galinhas caipiras alimentadas com dieta balanceada para postura. Os  
212 ovos foram limpos e quebrados manualmente e as gemas foram separadas do albume. Cada  
213 gema foi cuidadosamente rolada em um papel filtro para remoção da clara e vestígios de  
214 albumina aderidos à membrana vitelina. A membrana vitelina foi então rompida com auxílio  
215 de uma seringa e a gema foi coletada, transferida para um béquer e mantida resfriada por gelo.  
216 O volume da gema obtida foi diluída com um volume igual de solução de  $NaCl$  0,17 M e  
217 agitada com um agitador magnético durante 1 hora a 4° C. Essa solução foi centrifugada a  
218  $11,400 \times g$  por 75 minutos a 4 ° C e o sobrenadante (plasma) foi separado do sedimento  
219 (grânulos). O plasma foi então centrifugado novamente nas mesmas condições para a remoção  
220 total dos grânulos. O plasma obtido das centrifugações teve seu pH mensurado e corrigido  
221 para 8,7 com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N. O volume final, após ajuste  
222 do pH, foi mensurado com uma proveta graduada. O volume do plasma após correção do pH  
223 foi utilizado para calcular a quantidade em gramas de sulfato de amônio a ser adicionada a  
224 amostra para atingir uma concentração de 40%. O sulfato de amônio foi adicionado  
225 diretamente ao plasma, em pequenas quantidades, em um tempo médio de 50 minutos, em  
226 agitação contínua a 4°C. Após adição do sulfato de amônio, o conteúdo foi mantido em  
227 agitação por mais uma hora, seguida de centrifugação a  $11,400 \times g$  por 75 minutos a 4 °C.  
228 Para a diálise, o sobrenadante resultante da última centrifugação foi colocado na membrana  
229 Spectra<sup>®</sup> (Molecular porous membrane tubing; MNCO: 12-14,000, diâmetro 29mm). A  
230 membrana de diálise passou por uma hidratação antes do uso em água destilada por um  
231 período de 30 minutos. O plasma resultante da última centrifugação foi acondicionado dentro  
232 da membrana e dialisado em água bidestilada por no mínimo 30 horas. As trocas de água da  
233 diálise foram feitas a cada três horas. Depois do processo de diálise, o conteúdo de cada

234 membrana foi colocado em um béquer distinto e mantido resfriado por gelo até a  
235 homogeneização e depois foram colocados em tubos para centrifugação a  $11,400 \times g$  por 75  
236 minutos a  $4^\circ \text{C}$ . O material fluante, considerado o sobrenadante, resultante desta última  
237 centrifugação, contendo LDL, foi diluído ao meio BWW imediatamente após a centrifugação, o  
238 pH foi medido e ajustado para valores entre 7,3 e 7,4 e osmolaridade entre 298 e 319  
239 mOsmol/L, depois, o material foi aliquoteado e congelado a  $-20^\circ\text{C}$ .

240

### 241 **6.5 Local, animais e coleta**

242 O experimento foi realizado em um haras localizado no município de Itabuna, Bahia,  
243 Nordeste, Brasil (latitude  $14^\circ47'21''\text{Sul}$ , longitude  $39^\circ16'40''\text{Oeste}$ , altitude 63m). O local  
244 possui clima tropical, pluviosidade média anual de 11,56 mm e temperatura média anual de  
245  $23,4^\circ\text{C}$ . As análises seminais foram realizadas no LARA - UESC. O experimento foi  
246 realizado entre outubro de 2020 e novembro de 2021. Foram utilizados sete garanhões da raça  
247 Mangalarga Marchador, com idades entre 4 e 7 anos, com escore da condição corporal 4.  
248 Antes do início do experimento, todos os garanhões foram submetidos ao esgotamento das  
249 suas reservas espermáticas extragonadais, por meio de coletas de sêmen seriadas, por sete  
250 dias, com vagina artificial modelo Botucatu<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e auxílio de  
251 uma fêmea em estro natural ou estrogenizada como manequim. O ejaculado de cada garanhão  
252 foi coletado uma única vez.

253

### 254 **6.6 Processamento do sêmen**

255 Depois da coleta, o sêmen foi filtrado em filtro de nylon (Minitub<sup>®</sup>, Alemanha) para  
256 remoção da fração gel e avaliado macro e microscopicamente segundo o Colégio Brasileiro de  
257 Reprodução Animal (CBRA, 2013) antes da diluição e refrigeração. A concentração  
258 espermática foi aferida por câmara de Neubauer, após diluição 1:20 em solução de citrato de  
259 sódio formolizado a 4%. Somente os ejaculados com motilidade espermática mínima de 60 %,  
260 vigor espermático de 3 e 70 % de espermatozoides morfológicamente normais foram  
261 refrigerados.

262 Os sete ejaculados, foram diluídos 1:2 em BotuSêmen<sup>®</sup> para centrifugação a  $600 \times g$   
263 por 10 minutos. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi rediluído  
264 para obtenção de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL em diferentes diluidores, formando os  
265 seguintes grupos experimentais: D1) BotuSêmen<sup>®</sup> (controle positivo); D2) BWW (controle  
266 negativo; pH 7,31 e 307 mOsmol/L); D3) BWW + 2% de LDL (pH 7,36 e 319 mOsmol/L);  
267 D4) BWW + 4% de LDL (pH 7,30 e 313 mOsmol/L); D5) BWW + 6% de LDL (pH 7,35 e

268 310 mOsmol/L); D6) BWW + 8% de LDL (pH 7,35 e 304 mOsmol/L); D7) BWW + 10% de  
269 LDL (pH 7,35 e 298 mOsmol/L). Depois da diluição, os ejaculados foram avaliados de forma  
270 subjetiva, utilizando um microscópio de contrastede fase (1000x; Olympus® CX 31). Somente  
271 os ejaculados que apresentavam 60% de motilidade total, 50% de motilidade progressiva e 3  
272 de vigor espermático eram refrigerados.

273 O sêmen diluído foi submetido à refrigeração em caixa BotuFlex® até atingir a  
274 temperatura de 15 °C, onde permaneceu por um período médio de 6 horas, depois as amostras  
275 foram transferidas para uma refrigeradora MiniTube®, onde permaneceram por mais 24 horas  
276 na mesma temperatura de armazenamento.

277

## 278 **Análises do sêmen depois da refrigeração**

### 279 **6.7 Cinemática espermática**

280 A cinemática foi avaliada por um sistema computadorizado Sperm Class Analyser®  
281 (SCA - Microptics S.L, Evolution, Edição veterinária, Barcelona, Espanha). Os padrões  
282 utilizados para o ajuste do equipamento foram: 25 imagens/segundo com 25 Hz; tamanho de  
283 partícula capturado entre 4 e 75 µm/m<sup>2</sup>; espermatozoides considerados imóveis <10 µm/s,  
284 lentos <45 µm/s, médios de 45 a 90 µm/s e rápidos acima de 90 µm/s. Foram avaliados os  
285 seguintes parâmetros: Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade  
286 (LIN), Retilinearidade (STR), Índice de Oscilação (WOB) expressos em porcentagem (%);  
287 Velocidade Curvilinear (VCL), Velocidade Linear Progressiva (VSL) e Velocidade Média do  
288 Trajeto (VAP), expressas em micrômetros por segundos (µm/s); Amplitude do Deslocamento  
289 Lateral da Cabeça Espermática (ALH), expressa em micrômetros (µm); e Frequência do  
290 Batimento Flagelar Cruzado (BCF), expressa em Hertz (Hz).

291

### 292 **6.8 Avaliação da integridade estrutural das membranas**

293 A integridade estrutural das membranas, plasmática e acrossomal, foi avaliada  
294 utilizando um microscópio fluorescente (400X; Olympus® CX 31) após a coloração do  
295 espermatozoide com corantes fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto  
296 de propídio (IP) (HARRISON; VICKERS, 1990). A coloração com CFDA foi avaliada  
297 usando o conjunto padrão de filtro de fluoresceína, enquanto a coloração com IP foi avaliada  
298 usando o conjunto padrão de filtros de rodamina. Foram analisados 200 espermatozoides por  
299 amostra em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400 x, utilizando filtros de 480 a  
300 610 nm. Os espermatozoides foram classificados em três subpopulações: estruturalmente  
301 íntegro, com membrana plasmática e acrossomal intactas (IP-, CFDA+); parcialmente íntegro,

302 com membrana plasmática lesionada e acrossomal intacta (IP+, CFDA+); total perda da  
303 integridade, com membranas plasmáticas e acrossomal lesionadas (IP+, CFDA-). Para fins de  
304 avaliação da eficiência dos diluidores, considerou-se apenas o percentual de espermatozoides  
305 com membrana plasmática e acrossomal intactas.

306

### 307 **6.9 Avaliação da integridade funcional das membranas**

308 A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada utilizando o teste  
309 hiposmótico (HOST) com 50 µL da amostra diluída em 500 µL de uma solução de sacarose a  
310 100 mOsmol/L. Após a diluição, as amostras foram primeiro incubadas em banho seco a 37°C  
311 durante 30 minutos e posteriormente foram fixadas com 250 µL de solução de citrato de sódio  
312 formolizado a 4% e 200 células foram avaliadas usando um microscópio de contraste de fase  
313 (1000x; Olympus® CX 31).

314 A porcentagem de células reativas ao HOST foi calculada da seguinte forma:  $HOST\% = \% \text{ de alterações na região da cauda após o HOST} - \% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST}$  (MELO; HENRY, 1999). As alterações de cauda antes do teste foram analisadas  
316 por meio da técnica de preparação úmida, diluindo uma amostra de sêmen em solução de  
317 citrato de sódio formolizado a 4% para posterior avaliação das alterações morfológicas  
318 espermáticas segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), usando um  
319 microscópio de contraste de fase (1000x; Olympus® CX 31). Foram avaliados 200  
320 espermatozoides.

322

### 323 **6.10 Avaliação da integridade da cromatina espermática**

324 A integridade da cromatina espermática foi avaliada utilizando a técnica da  
325 metacromasia induzida pelo azul de toluidina (NAVES *et al.*, 2004). Foram confeccionados  
326 esfregaços com uma alíquota de 10 µL da amostra, secados em temperatura ambiente e  
327 fixados por 1 minuto em solução de Carnoy (3:1, 75 mL de álcool 100 % + 25 mL de ácido  
328 acético) e em seguida em álcool a 70 % por 3 minutos. Procedeu-se á hidrólise com ácido  
329 clorídrico 4N por 15 minutos, lavagem em água destilada e secagem em temperatura ambiente.  
330 Para a coloração do esfregaço foi depositado 20 µL da solução de azul de toluidina a 0,025 %  
331 (0,00125 g de azul de toluidina em 5 mL de solução de McIlveine, pH 4,0) entre lâmina e  
332 lamínula e avaliadas 500 células em microscopia de contraste de fase (1000x; Olympus® CX  
333 31). Os espermatozoides foram classificados da seguinte forma: com cromatina compacta  
334 (região da cabeça corada em azul claro) e com cromatina descompactada (região da cabeça  
335 corada em azul escuro ou violeta).

336

### 337 **6.11 Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides**

338 A atividade mitocondrial foi avaliada por meio da coloração de 3,3'-diaminobenzidina  
339 (DAB) (HRUDKA,1987), sendo que 20 µL da amostra foi incubada com 20 µL de DAB  
340 (1mg/mL de PBS) a 37°C por 60 minutos, na ausência de luz. Após a incubação foram feitos  
341 esfregaços, fixados em formol a 10 % por 10 minutos, lavados em água destilada e secados ao  
342 ar sob proteção da luz. Foram avaliadas 200 células em microscópio de contraste de fase  
343 (1000x; Olympus® CX 31). As células foram classificadas de acordo com o nível de  
344 deposição do corante na peça intermediária (PI). Na classe I, os espermatozoides  
345 apresentavam a PI totalmente corada (alta atividade mitocondrial); na classe II, os  
346 espermatozoides apresentavam mais de 50 % da PI corada (atividade mitocondrial  
347 intermediária); na classe III, apresentavam menos de 50 % da PI corada (baixa atividade  
348 mitocondrial) e na classe IV, não apresentavam coloração (atividade mitocondrial  
349 inexistente).

350

### 351 **6.12 Análises estatísticas**

352 O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerando o ganhão como  
353 um bloco. Foi utilizada análise de variância para testar as diferenças entre os tratamentos.  
354 Todos os pressupostos foram testados e quando violados foi utilizado a transformação boxcox  
355 por meio da função "boxcox" do pacote MASS versão 7.3-41 (VENABLES; RIPLEY,  
356 2002). Todas as análises foram feitas utilizando o software R (R Core Team, 2021), com um  
357 nível de significância de 5%. Para comparação múltiplas de médias foi utilizado o teste de  
358 Scott-Knott com o auxílio da função "SK" do pacote ScottKnott versão 1.3-0  
359 (JELIHOVSCHI, 2014).

360

## 361 **7. RESULTADOS**

362 O sêmen fresco dos ganhões foi avaliada de forma subjetiva, logo após a coleta. A  
363 média de motilidade total foi de 82,14%, da motilidade progressiva 74,28%, do vigor 4,3 e do  
364 teste hipósotico 65,6%.

365 Todos os diluidores preservaram de forma semelhante os espermatozoides depois da  
366 diluição realizada a fresco, antes do processo de refrigeração. A motilidade total variou de  
367 79,3 a 84,3%, a motilidade progressiva variou de 73,6 a 80,7% e o vigor ficou entre 4 e 5  
368 (escala de 1-5)



369 Depois de 24 horas de refrigeração a 15C° o meio BWW puro só conseguiu preservar de  
 370 forma semelhante ao BotuSêmen® o ALH (P > 0,05) por isso, não deve ser utilizado para  
 371 refrigeração de sêmen equino. O diluidor BotuSêmen® foi superior aos demais testados para  
 372 preservar os parâmetros de motilidade, VCL, VSL e BCF (P < 0,05). O diluidor BWW com  
 373 10% de LDL preservou a VAP semelhante ao BotuSêmen® (P > 0,05) e os dois foram  
 374 superiores aos demais diluidores (P < 0,05). Os diluidores BWW contendo concentrações de  
 375 LDL igual ou acima de 4% preservaram a STR semelhante ao BotuSêmen® (P > 0,05) e foram  
 376 superiores aos demais diluidores (P < 0,05). Os diluidores BotuSêmen® e BWW contendo 8 e  
 377 10% de LDL foram semelhantes e superiores aos demais para preservar a linearidade e o  
 378 índice de oscilação espermática (P < 0,05). Todos os diluidores testados preservaram a  
 379 atividade mitocondrial de forma similar (P > 0,05; Tabela 1).

380

381 Tabela 1 - Parâmetros seminais da cinética após de 24 horas de refrigeração

PARÂME- TROS	DILUIDORES							Erro padrão
	Botu Sêmen	BWW	BWW 2%	BWW 4%	BWW 6%	BWW 8%	BWW 10%	
			LDL	LDL	LDL	LDL	LDL	
MT (%)	57,0 <sup>a</sup>	7,9 <sup>c</sup>	19,3 <sup>c</sup>	28,0 <sup>b</sup>	32,1 <sup>b</sup>	33,8 <sup>b</sup>	39,1 <sup>b</sup>	4,6
MP (%)	16,2 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>	2,2 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b</sup>	1,9 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	1,8
VCL (µm/s)	40,1 <sup>a</sup>	11,1 <sup>b</sup>	15,9 <sup>b</sup>	22,0 <sup>b</sup>	18,7 <sup>b</sup>	22,7 <sup>b</sup>	27,4 <sup>b</sup>	4,6
VAP (µm/s)	24,0 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>	7,1 <sup>b</sup>	12,0 <sup>b</sup>	10,0 <sup>b</sup>	13,5 <sup>b</sup>	16,7 <sup>a</sup>	2,9
VSL (µm/s)	18,0 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>	4,2 <sup>b</sup>	7,4 <sup>b</sup>	6,4 <sup>b</sup>	8,9 <sup>b</sup>	10,9 <sup>b</sup>	2,0
STR (%)	67,2 <sup>a</sup>	23,1 <sup>b</sup>	27,5 <sup>b</sup>	47,1 <sup>a</sup>	41,4 <sup>a</sup>	51,3 <sup>a</sup>	53,4 <sup>a</sup>	8,8
LIN (%)	41,0 <sup>a</sup>	10,3 <sup>b</sup>	11,9 <sup>b</sup>	24,4 <sup>b</sup>	20,7 <sup>b</sup>	31,2 <sup>a</sup>	32,6 <sup>a</sup>	5,4
ALH (µm)	1,1	0,4	0,5	0,7	0,6	0,8	0,8	0,1
BCF (Hz)	8,5 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	1,4 <sup>b</sup>	2,83 <sup>b</sup>	2,4 <sup>b</sup>	3,1 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	0,8
DAB I (%)	58,9	31,9	43,6	49,0	50,3	50,3	45,9	6,6
DAB II (%)	5,4	8,6	16,9	13,4	16,3	17,9	24,4	3,8
DAB III (%)	3,1	3,5	3,1	3,1	3,0	3,2	3,9	5,5
DAB IV (%)	6,6	36,4	23,9	19,4	12,1	11,1	15,1	9,0

382

383 Motilidade Total (MT); Motilidade progressiva (MP); Velocidade Curvilinear (VCL); Velocidade  
 384 Média do Trajeto (VAP); Velocidade Linear Progressiva (VSL); Retilinearidade (STR); Linearidade  
 385 (LIN); Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH); Frequência do Batimento Flagelar  
 386 Cruzado (BCF); Alta atividade mitocondrial (DAB I); Atividade mitocondrial intermediária (DABII);

387 Baixa atividade mitocondrial (DAB III) e Atividade mitocondrial inexistente (DAB IV). <sup>abc</sup> As letras  
388 indicam diferenças dentro da linha (P<0,05).

389

390 O meio BWW não preservou a integridade estrutural dos espermatozoides (P < 0,05).

391 O meio BWW foi quem pior preservou a integridade funcional dos espermatozoides, seguido

392 pelo BotuSêmen<sup>®</sup> (P < 0,05), sendo os diluidores contendo LDL (2%, 4%,8%, 10%) com

393 melhor potencial de preservar essa característica espermática (P > 0,05). O diluidor contendo

394 6% da LDL, obteve menor porcentagem de espermatozoides normais em relação aos demais

395 diluidores testados (P > 0,05). Os diluidores testados resultaram em compactação de

396 cromatina acima de 93%, significando ótima preservação do DNA (P > 0,05; Tabela 2).

397

398

399 Tabela 2 – Avaliação da integridade estrutural, funcional, morfológica e da cromatina depois

400 de 24 horas de refrigeração a 15C° em diluidores

PARÂME- TROS	DILUIDORES							Erro padrão
	Botu Sêmen	BWW	BWW 2% LDL	BWW 4% LDL	BWW 6% LDL	BWW 8% LDL	BWW 10% LDL	
	CFDA+ (%)	47,0 <sup>a</sup>	12,2 <sup>b</sup>	38,4 <sup>a</sup>	48,6 <sup>a</sup>	45,4 <sup>a</sup>	52,8 <sup>a</sup>	
HOST (%)	38,6 <sup>b</sup>	20,1 <sup>c</sup>	57,9 <sup>a</sup>	57,4 <sup>a</sup>	55,6 <sup>a</sup>	48,7 <sup>a</sup>	51,3 <sup>a</sup>	4,5
Normais	75,9 <sup>a</sup>	81,6 <sup>a</sup>	87,6 <sup>a</sup>	83,6 <sup>a</sup>	81,6 <sup>b</sup>	83,7 <sup>a</sup>	88,1 <sup>a</sup>	2,1
DNA C (%)	94,7	93,3	93,7	93,7	95,1	94,6	95,4	0,6

401 Estruturalmente íntegro (CFDA+); Espermatozoides reativos ao teste hipósmotico (HOST);  
402 Espermatozoides normais (Normais); Cromatina Compactada (DNA C). <sup>abc</sup> As letras indicam  
403 diferenças dentro da linha (P<0,05).

404

405 Apenas um garanhão teve espermatozoides resistentes ao processo de refrigeração e

406 acondicionamento a 15° C por 48 horas. O meio BWW não manteve os espermatozoides deste

407 indivíduo de forma apropriada, resultando em motilidade total abaixo de 2% e demais

408 parâmetros cinemáticos zerados. Os diluidores BWW contendo diferentes concentrações de

409 LDL mantiveram a motilidade total entre 35,3% e 47,3%, sendo o BotuSêmen<sup>®</sup> o diluidor que

410 manteve a mais alta porcentagem de móveis 50,6%. Com relação aos demais parâmetros

411 cinemáticos avaliados, foi possível perceber uma pequena variação numérica entre o

412 BotuSêmen<sup>®</sup> e os diluidores contendo LDL. Contudo, vale ressaltar que todos os

413 espermatozoides diluídos em BWW com ou sem LDL manteve alta atividade mitocondrial

414 (acima de 67%) comparada com os espermatozoides refrigerados em BotuSêmen® (atividade  
415 mitocondrial alta de 2%).

416

## 417 **8. DISCUSSÃO**

418 Os resultados deste estudo demonstraram que depois de 24 horas de refrigeração a  
419 15° C, o meio BWW puro não conseguiu preservar os requisitos básicos de motilidade de  
420 forma eficiente, por isso, não deve ser utilizado para refrigeração de sêmen equino. A inclusão  
421 da LDL ao meio BWW em concentrações iguais ou superiores a 4%, podem ser alternativas  
422 interessantes para refrigerar sêmen de equinos e manter o diluidor quimicamente definido,  
423 principalmente por preservarem a integridade funcional dos espermatozoides melhor que o  
424 BotuSêmen®.

425 A lipoproteína é uma importante fonte lipídica, que pode ser utilizada ao meio, pois  
426 oferece proteção para a membrana espermática, através da deposição de colesterol e  
427 fosfolípídeo, proporcionando menos danos a membrana plásmatica do espermatozoide contra  
428 o choque, que é ocasionado pelas baixas temperaturas; menor quantidade das lipoproteínas de  
429 alta densidade (HDL) que atuam como acceptor removendo o colesterol responsável pela  
430 proteção das membranas plásmaticas; menor dano dos canais CatSper que são responsáveis  
431 pelo fluxo de cálcio intracelular; menor quantidade de progesterona circulante, responsável  
432 pela ativação do canal CatSper já citado; e maior quantidade de antioxidantes presentes  
433 (DALAL *et al.*, 2020). Então, somente o meio BWW puro, não conseguiu manter a  
434 viabilidade dos espermatozoides a temperatura de 15°C, então, o uso da LDL é muito  
435 importante no processo de refrigeração espermática.

436 Vale ressaltar, que o diluidor BWW já foi usado em testes e conseguiu manter o  
437 metabolismo celular espermático a uma temperatura de 37° C (DAVILA *et al.*, 2015) e a 22 °  
438 C por até seis dias (SWEGEN *et al.*, 2016), mas quando houve queda na temperatura para  
439 15° C, não se obteve sucesso. Este fator, pode ser explicado devido as modificações nos  
440 componentes lipídicos da membrana espermática, que na temperatura ambiente em torno de 22° C apresentam-se  
441 na forma física líquida, mas quando os espermatozoides são submetidos a temperatura inferior,  
442 principalmente a 4°C, podem ocorrer mudança de fase líquida para gel. Essa mudança física  
443 na membrana plasmática modifica sua estrutura, podendo alterar sua permeabilidade seletiva  
444 e causar mudanças estruturais e funcionais permanente (RAPHAEL, 2007) e que  
445 provavelmente, neste experimento foram intensificadas nas amostras diluídas em BWW.

446 No processo de refrigeração, ocorre também perda de colesterol e ácidos graxos poli-  
447 insaturados da membrana plásmatica, que levará a fosforilação da tirosina. Além disso, pode

448 ocorrer uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando também  
449 fosforilação da tirosina, gerando então capacitação espermática prematura e aumento do  
450 estresse oxidativo sofrido pelos espermatozoides (NARESH; ATREJA, 2015).

451 É importante ressaltar que nesse estudo, o sêmen de um único ganhão conseguiu ser  
452 refrigerado por um período acima de 48 horas. Esse animal já se mostrava superior aos  
453 demais, desde a avaliação do sêmen fresco, pós-diluído imediato e diluído após 24 horas de  
454 refrigeração, evidenciado que existem individualidades entre ganhões e até entre ejaculados  
455 do mesmo animal (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

456 Os diluidores suplementados com a LDL obtiveram resultados bons em alguns  
457 parâmetros e ruins para outros, baseado nas análises e comparações com o BotuSêmen<sup>®</sup>. O  
458 diluidor BotuSêmen<sup>®</sup>, foi superior aos demais diluidores testados para preservar os parâmetros  
459 de motilidade, VCL, VSL e BCF. Contudo, é importante relatar que o tratamento BWW com  
460 10% da LDL preservou a VAP semelhante ao BotuSêmen<sup>®</sup>, os tratamentos com BWW  
461 contendo LDL igual ou acima de 4% da LDL preservaram a STR semelhante ao BotuSêmen<sup>®</sup>.  
462 Os tratamentos com BWW em concentração da LDL igual ou acima de 8%, manteve a LIN  
463 igual ao BotuSêmen<sup>®</sup>.

464 Não houve diferença estatística nos parâmetros de atividade mitocondrial nos  
465 espermatozoides submetidos aos tratamentos. Os diluidores suplementados com a LDL  
466 obtiveram uma alta atividade mitocondrial em mais de 43% das amostras estudadas. O fato  
467 dos espermatozoides demonstrarem boa atividade mitocondrial é muito importante, pois já é  
468 sabido que a mitocôndria é um canal de formação do ATP, que gera energia para o  
469 metabolismo celular, contribuindo para o movimento total e progressivo de forma a garantir o  
470 deslocamento do espermatozoide pelo trato reprodutor das fêmeas, possibilitando a sua  
471 chegada até o destino final, a fecundação do oócito (PEÑA *et al.* 2003).

472 Os tratamentos contendo a LDL e o BotuSêmen<sup>®</sup> foram capazes de proporcionar uma  
473 ótima proteção a membrana acrossomal dos espermatozoides. Estudos recentes demonstraram  
474 que a LDL possui uma menor quantidade de progesterona circulante, em relação a gema de  
475 ovo pura (DALAL *et al.*, 2020) por um efeito filtrante da membrana de diálise (MORENO *et*  
476 *al.*, 2013). A progesterona circulante ativa o canal CatSper e este leva a capacitação  
477 espermática prematura pelo influxo de cálcio exacerbado para o interior da célula (LIPAR *et*  
478 *al.*, 1999). Então os diluidores suplementados com a LDL podem ter demonstrados resultados  
479 superiores nesses parâmetros de proteção a membrana acrossomal, por demonstrarem menor  
480 quantidade de progesterona circulante, culminando em um menor índice de capacitação  
481 espermática prematura. Além da já citada reposição de colesterol e fosfolípídeo das

482 membranas pela LDL, oferecendo uma maior proteção ao choque frio (MORENO *et al.*,  
483 2013).

484 Os diluidores contendo a LDL foram superiores ao BotuSêmen<sup>®</sup> e este foi superior ao  
485 BWW puro, no parâmetros de a integridade estrutural das membranas. Já é sabido que existe  
486 uma correlação positiva entre a motilidade e integridade estrutural então quanto maior é a  
487 integridade estrutural da membrana espermática, melhor poderão ser os parâmetros da cinética  
488 (PERUMA, 2018).

489 Todos os diluidores conseguiram manter a integridade da cromatina acima de 93%,  
490 onde o diluidor suplementado com 10% da LDL, conseguiu manter a integridade da cromatina  
491 em 95% dos casos, concordando com pesquisas realizadas na mesma espécie (MORENO *et*  
492 *al.*, 2013).

493 Apesar dos resultados positivos encontrados na maioria dos diluidores suplementados  
494 com a LDL, vale a ressalva de que em nosso estudo, foi utilizado o processo de centrifugação  
495 do ejaculado a 600g por 10 minutos, o que resulta em retirada de parte do plasma seminal.  
496 Esse fator, pode ter influenciado negativamente, em um dos efeitos da LDL sobre o  
497 espermatozoide, visto o plasma seminal possui proteínas muito importantes que se ligam a  
498 LDL, evitando o efluxo e prevenção da perda de colesterol e fosfolipídios, que são muito  
499 importantes na estabilização da membrana plásmicas no processo de refrigeração (DALAL  
500 *et al.*, 2020), então possa ser que o processo de centrifugação tenha diminuído o potencial de  
501 ação da LDL sobre a proteção espermática durante o processo de refrigeração.

502 Estudos realizados em equinos, demonstram que as concentração de 2% e 3% da LDL  
503 foram superiores as concentrações de 4% e 5%, para preservar os parâmetros de motilidade  
504 total e progressiva e integridade da membrana plásmatica e acrossoma, a uma temperatura de  
505 4°C, por apenas 1 hora (MORENO *et al.*, 2013). Outra pesquisa relata o uso da LDL em  
506 concentração de 6,8% adicionado ao BotuSêmen<sup>®</sup> a 5°C em sêmen de jumento (MELO *et al.*,  
507 2012). Pesquisas com sêmen criopreservado utilizando a LDL são mais comuns na literatura,  
508 onde se observou que 8% da LDL (MARTIN, 2005) e/ou 10 e 20% da LDL (SANTOS,  
509 2007), podem substituir a gema de ovo pura, na composição do diluente.

510 Em nosso estudo, a suplementação do meio BWW com a LDL surtiu efeito positivo  
511 aos espermatozoides, principalmente nas concentrações de 8% e 10%, podendo ser uma  
512 alternativa promissoras para refrigerar o sêmen equino e manter o diluidor quimicamente  
513 definido, porque conseguiram manter os parâmetros estudados de forma eficiente,  
514 preservando características de um bom diluidor (MIES FILHO, 1987).

515 No entanto, essas divergências das concentrações ideais da LDL nos diluidores para  
516 refrigeração de sêmen equino, podem ser explicadas por diversos fatores, tais como:  
517 diferença na composição dos diluidores base que foram utilizados nos estudos, onde cada  
518 componente do diluidor pode agir de uma forma distinta e interagir de uma forma negativa ou  
519 positiva com a LDL e a composição e presença ou não do plasma seminal de cada  
520 ejaculado/animal, que pode afetar a qualidade espermática (MORENO *et al.*, 2013; DALAL  
521 *et al.*, 2020). Outros fatores como tempo e temperatura de exposição, que o material foi  
522 acondicionado e técnica de conservação em que os espermatozoides são submetidos podem  
523 ajudar a entender essas divergências, como já citado anteriormente.

524 Ou seja, a depender do diluidor utilizado, composição do ejaculado, processo de  
525 conservação pelo frio (congelamento ou refrigeração), centrifugação ou não, em que os  
526 espermatozoides forem submetidos, poderá haver uma maior ou menor necessidade da  
527 concentração da LDL, para poder gerar um efeito benéfico de proteção dos espermatozoides.

528

## 529 **9. CONCLUSÃO**

530 O meio BWW não pode ser utilizado para refrigerar o sêmen equino a 15° C, mas a  
531 inclusão da LDL na concentração igual ou acima de 4%, pode ser uma alternativa interessante  
532 para refrigerar o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, por manter parâmetros  
533 cinemáticos importantes e a integridade funcional da membrana espermática. Embora, o  
534 protocolo de refrigeração necessite de alguns ajustes para tornar o diluidor BWW com LDL  
535 promissor, pesquisando concentrações de LDL superior a 10% e a retirada do processo de  
536 centrifugação para remoção do plasma seminal, tendo em vista que um dos mecanismos de  
537 ação das LDLs amplamente difundido é a ligação com proteínas do plasma seminal, evitando  
538 com isso, o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana gerando maior estabilidade.

539

## 540 **Agradecimentos**

541 Agradecemos a toda equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade  
542 Estadual de Santa Cruz (LARA), por todo apoio e ajuda durante as coletas no campo e  
543 análises laboratoriais. Agradecemos aos tratadores e proprietários dos animais por cederem os  
544 equinos durante toda fase experimental. Aos funcionários do Hospital Veterinário e do Centro  
545 de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz, em nome do professor  
546 Priminho, por muitas vezes cederem materiais e laboratórios para extração da LDL. Ao

547 colégio Brasileiro de Reprodução Animal, pela premiação de 1º lugar na área de equinos, ao  
548 nosso trabalho no XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL.

549 **Conflito de interesse:** nenhum.

550 **Fontes de financiamento**

551 Financiamento: Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado  
552 da Bahia (FAPESB) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
553 (CAPES).

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579 **Referências**

580

581 AMIRAT, L.; BENCHARIF, D.; VERA-MUNOZ, O.; BEL HADJ ALI, H.;  
 582 DESTRUMELLE, S.; DESHERCES, S.; SCHMIDT, E.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.  
 583 Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL  
 584 (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1209–  
 585 1214, 2009.

586

587 AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.;  
 588 COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg  
 589 yolk LDL: A comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**,  
 590 v. 61, n. 5, p. 895–907, 2004.

591

592 ANTON, M.; GANDEMER, G. Composition, solubility and emulsifying properties of  
 593 granules and plasma of egg yolk. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, p. 484–487, 1997.

594

595 BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; GARAND, A.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES,  
 596 S.; DELHOMME, G.; LANGLOIS, M. L.; BARRIÈRE, P.; DESTRUMELLE, S.; VERA-  
 597 MUNOZ, O.; & TAINTURIER, D. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders  
 598 containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). **Animal Reproduction Science**, v.  
 599 119, n. 3-4, p. 305-313, 2010.

600

601 BENCHARIF, D.; DORDAS-PERPINYA, M. Canine semen cryoconservation: emerging  
 602 data over the last 20 years. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. S2, p. 61–65, 2020.

603

604 CALVO, L.; DENNISON-LAGOS, L.; BANKS, S. M.; FUGGER, E. F.; SHERINS, R. J.  
 605 Chemical composition and protein source in the capacitation medium significantly affect the  
 606 ability of human spermatozoa to undergo follicular fluid induced acrosome reaction. **Human**  
 607 **Reproduction**, v. 8, n. 4, p. 575–580, 1993.

608

609 CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; RODRIGUEZ, S. A. F.; RECALDE, E. C. S.;  
 610 OLIVEIRA, B. M. M.; ALVES, M. B. R. Relação entre a qualidade do sêmen com a  
 611 endometrite pós-cobertura em equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n.  
 612 1, p. 169–174, 2017.

613

614 COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual de exame**  
 615 **andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte, p. 104, 2013.

616

617 CONSUEGRA, C.; CRESPO, F.; DORADO, J.; DIAZ-JIMENEZ, M.; PEREIRA, B.;  
 618 HIDALGO, M. Low-density lipoproteins and milk serum proteins improve the quality of  
 619 stallion sperm after vitrification in straws. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. S4,  
 620 p. 86–89, 2019.

621

622 DALAL, J.; CHANDOLIA, R. K.; PAWARIA, S.; KUMAR, A.; KUMAR, D.; SELOKAR,  
 623 N. L. Low-density lipoproteins protect sperm during cryopreservation in buffalo: unraveling  
 624 mechanism of action. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 12, p. 1231–  
 625 1244, 2020.

626

627 DARR, C. R.; VARNER, D. D.; TEAGUE, S.; CORTOPASSI, G. A.; DATTA, S.;



- 628 MEYERS, S. A. Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with  
629 dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production. **Biology of**  
630 **Reproduction**, v. 95, n. 2, p. 1–11, 2016.
- 631  
632 DAVILA, M. P.; MUÑOZ, P. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O.; SILVA C. C. B.;  
633 PEÑA, F. J. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane  
634 integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the  
635 inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–21,  
636 2015.
- 637  
638 DONG, Q. X.; RODENBURG, S. E.; HILL, D.; VANDEVOORT, C. A. The role of low-  
639 density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg  
640 yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p.  
641 459–464, 2011.
- 642  
643 FARRÁS, M.; FIORATTI, E.; RAMIRES NETO, C.; CARMO, M.; OLIVEIRA, R.; PAPA,  
644 F.; PUOLI FILHO, J.; ALVARENGA, M. Comparação de diferentes temperaturas de  
645 armazenamento de sêmen refrigerado de garanhões da raça mangalarga marchador e quarto de  
646 milha. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 187–195, 2014.
- 647  
648 GHOSH, S.; SERAFINI, R.; LOVE, C. C.; TEAGUE, S. R.; HERNÁNDEZ-AVILÉS, C.;  
649 LACAZE, K. A.; VARNER, D. D. Effects of media and promoters on different lipid  
650 peroxidation assays in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 211, 2019.
- 651  
652 GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; QUADRELLI, J.; SMITH, N. D.; AITKEN, R. J. L-  
653 carnitine and pyruvate are pro-survival factors during the storage of stallion spermatozoa at  
654 room temperature. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 4, p. 1–9, 2015.
- 655  
656 GOMES, G. M.; GOMES, L. P. M. Principais distúrbios reprodutivos observados em  
657 garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. Supl. 6, p. 210–215,  
658 2009.
- 659  
660 GOMES, G. M.; PATRÃO, L.; GOMES, D. M. Problemas e soluções com o uso de sêmen  
661 congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de**  
662 **Reprodução Animal**, n. Supl 6, p. 210–215, 2009.
- 663  
664 GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; PEÑA, F. J.; MACÍAS-GARCÍA, B.  
665 Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and  
666 mitochondria. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 415–422, 2012.
- 667  
668 GRABNER, A.P. **Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide**  
669 **de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e Bugio (*Alouatta caraya***  
670 **e *Alouatta guariba clamitans*)**. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e  
671 Zootecnia da USP. p. 1–125, 2016.
- 672  
673 GRAHAM, J. K. e PARKS, J. E. Effects of cryopreservation procedures on sperm  
674 membranes. **Theriogenology** v. 38, p. 209–222, 1992.
- 675  
676 GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree  
677 of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing.

- 678 **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42–52, 1987.  
679
- 680 HARRISON, R.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in  
681 mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 342-352,  
682 1990.  
683
- 684 HOWARD, J. G.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Teratospermic and  
685 normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary—gonadal hormones, and improvement  
686 of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. **Journal of Andrology**,  
687 v. 11, n. 3, p. 204–215, 1990.  
688
- 689 HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in  
690 spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress.  
691 **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-928, 1987.  
692
- 693 Hu, J.; Li, Q.; Zan, L.; Jiang, Z.; An, J. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins  
694 in extenders on bull spermatozoa following freezing – thawing. **Animal Reproduction  
695 Science** v. 117, n. 1-2, p. 11–17, 2010.  
696
- 697 IAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; ROSATO, M. P.; MANCHISI, A. Cryopreservation of  
698 rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations  
699 of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. **Animal  
700 Reproduction Science**, v. 151, n. 3–4, p. 220–228, 2014.  
701
- 702 INSTITUTO FPN. **Anuário da Pecuária Brasileira**. 20 ed. São Paulo, Brasil, 100 p., 2017.  
703
- 704 JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma  
705 dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen.  
706 **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1059–1067, 1991.  
707
- 708 JELIHOVSCHI, E. G.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, E. B. **Scott Knott: a package for  
709 performing the Scott-Knott clustering algorithm in R**. TEMA, São Carlos, v. 15, n. 1,  
710 2014.  
711
- 712 JIANG, Z.; LI, Q.; LI, W. Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing –  
713 thawing boar sperm by neutral comet assay. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 401–  
714 407, 2007.  
715
- 716 KAMPSCHMIDT, R. F.; MAYER, D. T.; HERMAN, H. A. Lipid and lipoprotein  
717 constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. **Journal of Dairy  
718 Science**, v. 36, n. 7, p. 733–742, 1953.  
719
- 720 LIN, M.; ZHANG, X.; MURDOCH, R. N.; AITKEN, R. J. Swim-up of tammar wallaby  
721 (*Macropus eugenii*) spermatozoa in Biggers, Whitter and Whittingham (BWW) medium:  
722 maximisation of sperm motility, minimisation of impairment of sperm metabolism and  
723 induction of sperm hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 2,  
724 p. 345–356, 2017.  
725
- 726 LIPAR, J. L.; KETTERSON, E. D.; NOLAN, V.; CASTO, J. M. Egg yolk layers vary in the  
727 concentration of steroid hormones in two avian species. **General and Comparative**

- 728 **Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 220–227, 1999.  
729
- 730 LOAIZA-ECHEVERRI, A. M.; CRUZ, B. C.; SNOECK, P. P. N.; MORA, L. C. O.; NEVES,  
731 B. P.; NEVES, M. M.; HENEINE, L. G. D.; HENRY, M. Low density lipoproteins added to  
732 an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting ovine sperm cells than  
733 when 16% whole egg yolk was added. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1335–1346,  
734 2015.  
735
- 736 MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian  
737 oocytes in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 196, n. 2, p. 189–195, 1976.  
738
- 739 MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine  
740 seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of**  
741 **Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250–1258, 2002.  
742
- 743 MARTIN, C. E. G. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas**  
744 **características funcionais dos espermatozoides eqüinos criopreservados**. Tese de  
745 Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. p. 17, 2005.  
746
- 747 MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MARTÍNEZ, F.; ÁLVAREZ, M.; MAROTO-MORALES, A.;  
748 GARCÍA-ALVAREZ, O.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; PAZ, P.; ANEL, L. Cryopreservation  
749 of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation.  
750 **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 628–638, 2009.  
751
- 752 MEDEIROS, A. S. L. **Resistência omótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de**  
753 **garanhões frente a diferentes crioprotetores**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual  
754 Paulista (Unesp) p. 94 f., 2007.  
755
- 756 MELO, M. I. V.; HENRY, M. Hypoosmotic test for the evaluation of equine semen. **Arquivo**  
757 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51 n. 1, p. 71–8, 1999.  
758
- 759 MELO, M. I. V.; RESENDE, Y. F.; REZENDE, E. P.; SNOECK, P. P. N.; GOMES, D. M. L.;  
760 CARVALHO, T. T. C.; SILVA, A. V. D.; NEVES, M. M.; BASTOS, D. G.; HENRY, M. R.  
761 J. M. Uso de lipoproteínas de baixa densidade e de gema de ovo na preservação do sêmen  
762 asinino resfriado a 6°C. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, n. 4, p. 288-294,  
763 2012.  
764
- 765 MIES-FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. Sulina. 2. ed. Porto  
766 Alegre, 1987.  
767
- 768 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Revisão do**  
769 **Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Disponível em:  
770 [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camarasetoriais/equideocultura/anosanteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-doagronegocio-do-cavalo/view&gt;)  
771 [tematicas/documentos/camarasetoriais/equideocultura/anosanteriores/revisao-do-estudo-do-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camarasetoriais/equideocultura/anosanteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-doagronegocio-do-cavalo/view&gt;)  
772 [complexo-doagronegocio-do-cavalo/view&gt;](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camarasetoriais/equideocultura/anosanteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-doagronegocio-do-cavalo/view&gt;); Acesso em: 20 set. 2017.  
773
- 774 MORAN D. M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of  
775 temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Animal**  
776 **Reproduction Science**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.  
777

- 778 MORENO, D.; BENCHARIF, D.; AMIRAT-BRIAND, L.; NEIRA, A.; DESTRUMELLE,  
779 S.; TAINTURIER, D. Preliminary results: The advantages of low-density lipoproteins for the  
780 cryopreservation of equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 12, p.  
781 1068–1075, 2013.
- 782
- 783 MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low  
784 density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on  
785 frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695–1706, 2002.
- 786
- 787 MOUSTACAS, V. S.; ZAFFALON, F. G.; LAGARES, M. A.; LOAIZA-ECCHEVERRI, A.  
788 M.; VARAGO, F. C.; NEVES, M. M.; HENEINE, L. G. D.; ARRUDA, R. P.; HENRY, M.  
789 Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg  
790 yolk for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 75, n. 2, p. 300–307, 2011.
- 791
- 792 NAKAMURA, R.; HAYAKAWA, M.; SATO, Y. Isolation and Fractionation of the Protein  
793 Moiety of Egg Yolk Low Density Lipoprotein. **Poultry Science**, v. 56, n. 4, p. 1148–1152,  
794 1977.
- 795
- 796 NARESH, S.; ATREJA, S. K. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro  
797 capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p.  
798 211–216, 2015.
- 799
- 800 NASCIMENTO, J. N.; BLUME, H.; OLIVEIRA, F. J. G.; OLIVEIRA, R. A. Utilização de  
801 diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões mangalarga  
802 marchador. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 324–330, 2015.
- 803
- 804 NAVES, C. S.; BELETTI, M. E.; DUARTE, M. B.; VIEIRA, R. C. Avaliação da cromatina  
805 espermática em equinos com azul de toluidina e acridine orange. **Bioscience Journal**, v. 20,  
806 n. 20, 117–124, 2004.
- 807
- 808 NEVES, M.; HENRY, M. Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de  
809 baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão. **Revista Brasileira de**  
810 **Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 209–214, 2012.
- 811
- 812 PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa  
813 during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, p.1144-1149, 1974.
- 814
- 815 PEÑA, F. J.; JOHANNISON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.;  
816 Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial  
817 membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal**  
818 **Reproduction Science**, v. 78, n. 1–2, p. 85-98, 2003.
- 819
- 820 PERUMA, P. Low density lipoprotein in cryopreservation of semen. **Asian Pacific Journal**  
821 **of Reproduction**, v: 7, n: 3, p. 103-116; 2018.
- 822
- 823 PERUMA, P.; SRIVASTAVA, S. K.; GHOSH, S. K.; BARUAH, K. K.; KHAN, M. H.;  
824 RAJORIYA, J. S.; SRIVASTAVA, N. Effect of low density lipoprotein on replacement of  
825 egg yolk in liquid preservation of mithun semen. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 86,  
826 n. 4, p. 427–430, 2016.
- 827

- 828 PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A Yolk-Buffer Pabulum for the Preservation of Bull  
829 Semen. **Journal of Dairy Science**, v. 23, n. 5, p. 399–404, 1940.
- 830
- 831 PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.;  
832 DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk  
833 in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 105–114, 2011.
- 834
- 835 **R. R Foundation for Statistical Computing**. Versão 4.1.2. Viena, 2021. Software.
- 836
- 837 RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade**  
838 **e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado**. Tese de  
839 Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. p. 112, 2007.
- 840
- 841 SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction**  
842 **Science**, v. 62, n. 1–3, p. 77–111, 2000.
- 843
- 844 SANTIAGO-MORENO, J.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; COLOMA, M. A.;  
845 LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; PRIETO, M. T.; CAMPO, J. L. Cryoprotective and contraceptive  
846 properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p.  
847 230–234, 2012.
- 848
- 849 SANTOS, G. C. J. **Estudos de diferentes protocolos utilizando lipoproteínas de baixa**  
850 **densidade na criopreservação do sêmen equino**. Tese de doutorado pela Universidade  
851 Federal de Minas Gerais, p. 81, 2007.
- 852
- 853 SHAHVERDI, A.; SHARAFI, M.; GOURABI, H.; YEKTA, A. A.; ESMAEILI, V.;  
854 SHARBATOGHLI, M.; JANZAMIN, E.; HAJNASROLLAHI, M.; MOSTAFAYI, F.  
855 Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation  
856 medium containing low-density lipoprotein. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 78–85, 2015.
- 857
- 858 SNOECK, P. P. N.; MOURA, L. C. O.; CLEMENTE, C. A. A.; LOAIZA-ECHEVERRI, A.  
859 M.; NEVES, M. M.; ALLAMAN, I. B.; HENRY, M. Effect of catalase, superoxide dismutase  
860 and reduced glutathione in LDL extender on ovine cryopreserved sperm viability. **Semina:**  
861 **Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2593–2601, 2015.
- 862
- 863 SNOECK, P. P. N.; PESSOA, T. H. O.; PEREIRA, M. G. S.; BASTOS, I. C. L.; MELO, M. I.  
864 V. Can we use LDL instead of egg yolk in BotuCrio<sup>®</sup> extender to cryopreserve sperm from  
865 the Mangalarga Marchador stallion? **Animal Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 340–347, 2019.
- 866
- 867 SWEGEN, A.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J.; GIBB, Z. Rosiglitazone improves  
868 stallion sperm motility, ATP content, and mitochondrial function. **Biology of Reproduction**,  
869 v. 95, n. 5, p. 1–12, 2016.
- 870
- 871 TSUTSUI, T. Functional Properties of Heat-Treated Egg Yolk Low Density Lipoprotein.  
872 **Journal of Food Science**, v. 53, n. 4, p. 1103–1106, 1988.
- 873
- 874 VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; ULGUIM, R. R.; ALVARENGA, M. V. F.;  
875 BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N.; LUCIA, T.; DESCHAMPS, J. C. Effect of low density  
876 lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.  
877 115, n. 1–4, p. 323–327, 2009.

878

879 VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**. 4 ed. Springer,  
880 Alemanha, 2002.

881

882 VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; DIAZ, T.; VÁSQUEZ, L.; SCHMIDT, E;  
883 DESHERCES S; ANTON, M.; BENCHARIF, D.; & TAINURIER, D. Effect of semen  
884 dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine  
885 spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and  
886 Bioxcell®. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 895–900, 2009.

887

888 WATSON, P. F.; MARTIN, I. C. A. The influence of some fractions of egg yolk on the  
889 survival of ram spermatozoa at 5°C. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p.  
890 145–152, 1975.

891

892 WHITTEN, W. K.; BIGGERS, J. D. Complete development in vitro of the pre-implantation  
893 stages of the mouse in a simple chemically defined medium. **Journal of reproduction and  
894 fertility**, v. 17, n. 2, p. 399–401, 1968.

895

896 YAMAUCHI, S.; NAKAMURA, S.; LAY, K. M.; AZUMA, T.; YAKABI, T.; MUTO, N.;  
897 NAKADA, T.; ASHIZAWA, K.; TATEMOTO, H. Characteristics of okinawan native agu pig  
898 spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to freezing extender. **Journal of  
899 Reproduction and Development**, v. 55, n. 5, p. 558–565, 2009.

900

901

## ANEXO I - REGRAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

### Introdução

*O Journal of Equine Veterinary Science (JEVS)* é uma publicação internacional destinada ao veterinário e pesquisador equino e outros especialistas em saúde equina. Publicado mensalmente, cada edição do *JEVS* inclui pesquisas originais, revisões, relatos de casos, comunicações breves e técnicas clínicas de líderes no campo da veterinária equina, cobrindo tópicos como laminite, reprodução, doenças infecciosas, parasitologia, comportamento, podologia, medicina interna, cirurgia e nutrição. *JEVS* também é uma publicação oficial da Equine Science Society.

### Tipos de artigo

1. Artigos de pesquisa originais (artigos regulares)
2. Artigos de revisão
3. Relatos de Casos
4. Comunicações Curtas
5. Técnicas Clínicas

*Pesquisa original:* Pesquisa ou relatórios clínicos extensos contendo novas descobertas significativas. O material apresentado deve ser original e não ter sido publicado em outro lugar, exceto de forma preliminar. Os artigos serão revisados por revisores familiarizados com o assunto do artigo. As revisões são provavelmente esperadas.

### Lista de verificação de submissão

Você pode usar esta lista para fazer uma verificação final de sua submissão antes de enviá-la à revista para revisão. Por favor, verifique a seção relevante neste Guia para Autores para mais detalhes.

### Certifique-se de que os seguintes itens estejam presentes:

Um autor foi designado como o autor para correspondência com os dados de contato:

Endereço de e-mail

Endereço postal completo

Todos os arquivos necessários foram carregados:

*Manuscrito:*

Incluir palavras-chave

Todas as figuras (incluir legendas relevantes)

Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé)

Garantir que todas as citações de figuras e tabelas no texto correspondam aos arquivos fornecidos

Indique claramente se são coloridas, deve ser usado para quaisquer figuras em *arquivos* impressos de *resumos gráficos / realces* (quando aplicável).

*Arquivos suplementares* (quando aplicável)

Considerações adicionais• O manuscrito foi 'verificado a ortografia' e 'a gramática'

- Todas as referências mencionadas na Lista de Referências são citadas no texto e vice-versa
- Foi obtida permissão para o uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo a Internet)
- Uma declaração de interesses conflitantes é fornecida, mesmo se os autores não tiverem interesses conflitantes a declarar
- Uma declaração de bem-estar animal / ética é fornecida e deve ser carregada como um documento separado
- As políticas do periódico detalhadas neste guia foram revisadas
- Sugestões de árbitros e contato detalhes fornecidos, com base nos requisitos do diário

Para obter mais informações, visite nosso [Centro de Suporte](#) .

## **Ética na publicação**

Consulte nossas informações sobre [Ética na publicação](#) .

As circunstâncias de bem-estar animal relacionadas à experimentação animal devem atender aos Princípios Orientadores Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, conforme emitido pelo Conselho para as Organizações Internacionais de Ciências Médicas. Eles podem ser obtidos no seguinte URL: [http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm) . Uma declaração de bem-estar animal deve ser declarada em um ponto apropriado do artigo. A crueldade desnecessária na experimentação animal não é aceitável para os editores do *Journal of Equine Veterinary Science* .

## **Conflito de interesses**

Todos os autores devem divulgar quaisquer relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou organizações que possam influenciar inadequadamente (enviesar) seu trabalho. Exemplos de potenciais interesses conflitantes incluem emprego, consultorias, propriedade de ações,



honorários, depoimento de especialista pago, aplicações / registros de patentes e concessões ou outros fundos. Os autores devem divulgar quaisquer interesses em dois locais: 1. Uma declaração resumida da declaração de interesses no arquivo da página de título (se duplo-cego) ou no arquivo do manuscrito (se simples-cego). Se não houver interesses a declarar, indique o seguinte: 'Declarações de interesses: nenhum'. Esta declaração resumida será finalmente publicada se o artigo for aceito. 2. Divulgações detalhadas como parte de um formulário separado de Declaração de Interesse, que faz parte dos registros oficiais da revista.

### **Declaração de submissão e verificação**

A submissão de um artigo implica que o trabalho descrito não foi publicado anteriormente (exceto na forma de um resumo, uma palestra publicada ou tese acadêmica, consulte '[Publicação múltipla, redundante ou simultânea](#)' para obter mais informações), que não está sob consideração para publicação em outro lugar, que sua publicação seja aprovada por todos os autores e tácita ou explicitamente pelas autoridades responsáveis onde o trabalho foi realizado, e que, se aceita, não será publicada em outro lugar da mesma forma, em inglês ou em qualquer outro idioma, inclusive eletronicamente, sem o consentimento por escrito do detentor dos direitos autorais. Para verificar a originalidade, seu artigo pode ser verificado pelo serviço de detecção de originalidade [Crossref Similarity Check](#).

### **Preprints**

Observe que os [preprints](#) podem ser compartilhados em qualquer lugar e a qualquer momento, de acordo com a [política de compartilhamento](#) da Elsevier. Compartilhar suas pré-impressões, por exemplo, em um servidor de pré-impressão, não contará como publicação anterior (consulte '[Publicação múltipla, redundante ou simultânea](#)' para obter mais informações).

### **Publicação de pré-impressão no SSRN**

Em apoio à [Ciência Aberta](#), este periódico oferece aos seus autores um serviço gratuito de publicação de pré-impressão. Os pré-impressos fornecem registro e divulgação antecipada de sua pesquisa, o que facilita citações e colaboração antecipadas.

Durante a submissão ao Gerente Editorial, você pode escolher liberar seu manuscrito publicamente como uma pré-impressão no servidor de pré-impressão [SSRN](#), uma vez que ele entre na revisão por pares com o periódico. Sua escolha não afetará o processo editorial ou o

resultado com a revista. Observe que o autor correspondente deve buscar a aprovação de todos os co-autores antes de concordar em liberar o manuscrito publicamente no SSRN.

Você será notificado por e-mail quando sua pré-impressão for postada online e um Identificador de Objeto Digital (DOI) for atribuído. Sua pré-impressão permanecerá globalmente disponível gratuitamente para leitura, independentemente de o periódico aceitar ou rejeitar o seu manuscrito.

Para obter mais informações sobre como postar no SSRN, consulte os Termos de Uso e Perguntas frequentes do SSRN.

### **Uso de linguagem inclusiva**

A linguagem inclusiva reconhece a diversidade, transmite respeito a todas as pessoas, é sensível às diferenças e promove a igualdade de oportunidades. O conteúdo não deve fazer suposições sobre as crenças ou compromissos de qualquer leitor; não contenham nada que possa implicar que um indivíduo seja superior a outro em razão de idade, sexo, raça, etnia, cultura, orientação sexual, deficiência ou condição de saúde; e usar uma linguagem inclusiva em todo o processo. Os autores devem garantir que a escrita esteja livre de preconceitos, estereótipos, gírias, referências à cultura dominante e / ou suposições culturais. Aconselhamos buscar a neutralidade de gênero usando substantivos no plural ("clínicos, pacientes / clientes") como padrão / sempre que possível, para evitar o uso de "ele, ela" ou "ele / ela". Recomendamos evitar o uso de descritores que se referem a atributos pessoais, como idade, gênero, raça, etnia, cultura, orientação sexual, deficiência ou condição de saúde, a menos que sejam relevantes e válidos. Quando a terminologia de codificação é usada, recomendamos evitar termos ofensivos ou excludentes, como "mestre", "escravo", "lista negra" e "lista branca". Sugerimos o uso de alternativas mais apropriadas e (auto-) explicativas, como "primária", "secundária", "lista de bloqueio" e "lista de permissões". Estas diretrizes são um ponto de referência para ajudar a identificar a linguagem apropriada, mas não são de forma alguma exaustivas ou definitivas. "escravo", "lista negra" e "lista branca". Sugerimos o uso de alternativas mais apropriadas e (auto-) explicativas, como "primária", "secundária", "lista de bloqueio" e "lista de permissões". Estas diretrizes são um ponto de referência para ajudar a identificar a linguagem apropriada, mas não são de forma alguma exaustivas ou definitivas. "escravo", "lista negra" e "lista branca". Sugerimos o uso de alternativas mais apropriadas e (auto-) explicativas, como "primária", "secundária", "lista de bloqueio" e "lista de permissões". Estas diretrizes são um ponto de referência para ajudar a identificar a linguagem apropriada, mas não são de forma alguma exaustivas ou definitivas.

## **Contribuições dos autores**

Para maior transparência, encorajamos os autores a enviar um arquivo de declaração do autor descrevendo suas contribuições individuais para o artigo usando as funções relevantes do CRediT: Conceituação; Curadoria de dados; Análise formal; Aquisição de financiamento; Investigação; Metodologia; Administração de projetos; Recursos; Programas; Supervisão; Validação; Visualização; Funções / Escrita - rascunho original; Escrita - revisão e edição. As declarações de autoria devem ser formatadas com os nomes dos autores primeiro e a (s) função (ões) CRediT a seguir. [Mais detalhes e um exemplo.](#)

## **Autoria**

Todos os autores devem ter feito contribuições substanciais para todos os seguintes: (1) a concepção e desenho do estudo, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação de dados, (2) redação do artigo ou revisão crítica para importantes intelectuais conteúdo, (3) aprovação final da versão a ser submetida.

## **Mudanças na autoria**

Espera-se que os autores considerem cuidadosamente a lista e a ordem dos autores antes de enviar seu manuscrito e forneçam a lista definitiva de autores no momento da submissão original. Qualquer adição, exclusão ou reorganização dos nomes dos autores na lista de autoria deve ser feita somente antes do manuscrito ser aceito e somente se aprovado pelo Editor do periódico. Para solicitar tal alteração, o Editor deve receber o seguinte do autor para correspondência: (a) o motivo da alteração na lista de autores e (b) confirmação por escrito (e-mail, carta) de todos os autores de que concordam com a adição, remoção ou reorganização. No caso de adição ou remoção de autores, isso inclui a confirmação do autor sendo adicionado ou removido. Somente em circunstâncias excepcionais o Editor considerará a adição, exclusão ou reorganização de autores após o manuscrito ter sido aceito. Enquanto o Editor considerar a solicitação, a publicação do manuscrito será suspensa. Se o manuscrito já foi publicado em uma edição online, qualquer solicitação aprovada pelo Editor resultará em uma retificação.

## **Copyright**

Ao aceitar um artigo, os autores serão solicitados a preencher um 'Contrato de publicação de

periódico' (veja [mais informações](#) sobre isso). Um e-mail será enviado ao autor correspondente, confirmando o recebimento do manuscrito, juntamente com um formulário de 'Contrato de Publicação de Periódicos' ou um link para a versão online deste contrato.

Os assinantes podem reproduzir índices ou preparar listas de artigos, incluindo resumos para circulação interna em suas instituições. [A permissão](#) do Editor é necessária para revenda ou distribuição fora da instituição e para todos os outros trabalhos derivados, incluindo compilações e traduções. Se trechos de outras obras protegidas por direitos autorais forem incluídos, o (s) autor (es) devem obter permissão por escrito dos proprietários dos direitos autorais e creditar a (s) fonte (s) no artigo. A Elsevier possui [formulários pré - impressos](#) para uso pelos autores nesses casos.

Para artigos de acesso aberto ouro: Após a aceitação de um artigo, os autores serão solicitados a preencher um 'Contrato de Licença' ( [mais informações](#) ). A reutilização permitida de artigos de ouro de acesso aberto por terceiros é determinada pela escolha da [licença de usuário](#) do autor.

### **Direitos de autor**

Como autor, você (ou seu empregador ou instituição) tem certos direitos para reutilizar seu trabalho. [Mais informações](#).

### **Elsevier apóia o compartilhamento responsável**

Descubra como você pode [compartilhar sua pesquisa](#) publicada em periódicos da Elsevier.

### **Função da fonte de financiamento**

Solicita-se que você identifique quem forneceu apoio financeiro para a realização da pesquisa e / ou preparação do artigo e descreva resumidamente a função do (s) patrocinador (es), se houver, no desenho do estudo; na coleta, análise e interpretação dos dados; na redação do relatório; e na decisão de submeter o artigo para publicação. Se a (s) fonte (s) de financiamento não tiveram tal envolvimento, isso deve ser declarado.

### **Acesso**

**aberto**

Visite nossa [página de acesso aberto](#) para obter mais informações.

**Elsevier Researcher Academy**

A Researcher Academy é uma plataforma de e-learning gratuita projetada para apoiar pesquisadores em início e meio de carreira ao longo de sua jornada de pesquisa. O ambiente "Aprender" na Researcher Academy oferece vários módulos interativos, webinars, guias para download e recursos para guiá-lo através do processo de redação para pesquisa e revisão por pares. Sinta-se à vontade para usar esses recursos gratuitos para melhorar seu envio e navegar pelo processo de publicação com facilidade.

### **Idioma (serviços de uso e edição)**

Escreva seu texto em um bom inglês (o uso americano ou britânico é aceito, mas não uma mistura dos dois). Os autores que acham que seu manuscrito em inglês pode exigir edição para eliminar possíveis erros gramaticais ou ortográficos e para estar em conformidade com o inglês científico correto podem desejar usar o serviço de edição em inglês disponível nos Serviços para autoria da Elsevier.

### **Submissão**

Nosso sistema de submissão online o orienta passo a passo pelo processo de inserir os detalhes do seu artigo e enviar seus arquivos. O sistema converte seus arquivos de artigo em um único arquivo PDF usado no processo de revisão por pares. Arquivos editáveis (por exemplo, Word, LaTeX) são necessários para escrever seu artigo para publicação final. Toda a correspondência, incluindo notificação da decisão do Editor e pedidos de revisão, é enviada por e-mail.

**Envie seu artigo**

Envie seu artigo via <https://www.editorialmanager.com/JEVS/default.aspx> .

### **Árbitros**

Envie, como parte da carta de apresentação com o manuscrito, os nomes, afiliação completa (departamento, instituição, cidade e país) e endereços de e-mail de até 5 possíveis árbitros. Os revisores apropriados devem ter conhecimento sobre o assunto, mas não devem ter nenhuma conexão próxima com nenhum dos autores. Além disso, os Árbitros devem ser de instituições que não sejam (e de preferência países que não sejam) de qualquer um dos Autores. Você também pode sugerir revisores que não deseja revisar seu manuscrito, mas indique as razões para fazê-lo. Os Editores retêm o direito de escolher revisores conforme apropriado. Todas as submissões serão revisadas por pelo menos dois revisores anônimos para avaliá-los quanto à

originalidade, declaração clara de uma hipótese, projeto experimental apropriado, completude de métodos, uma discussão lógica e abrangente.

### **Consultas**

Para perguntas sobre o processo editorial (incluindo o status dos manuscritos em revisão) ou para suporte técnico nas submissões, visite nosso [Centro de Suporte](#).

### **Revisão por pares**

Este periódico opera um único processo de revisão anônimo. Todas as contribuições serão avaliadas inicialmente pelo editor quanto à adequação ao periódico. Os artigos considerados adequados são normalmente enviados a um mínimo de dois revisores especialistas independentes para avaliar a qualidade científica do artigo. O Editor é responsável pela decisão final quanto à aceitação ou rejeição dos artigos. A decisão do Editor é final. Os editores não estão envolvidos em decisões sobre artigos que eles próprios escreveram ou foram escritos por parentes ou colegas ou que se relacionam com produtos ou serviços nos quais o editor tem interesse. Qualquer submissão está sujeita a todos os procedimentos usuais da revista, com revisão por pares tratada independentemente do editor relevante e seus grupos de pesquisa. [Mais informações sobre os tipos de revisão por pares](#).

### **Uso de software de processamento de texto**

É importante que o arquivo seja salvo no formato nativo do processador de texto usado. O texto deve estar em formato de coluna única. Mantenha o layout do texto o mais simples possível. A maioria dos códigos de formatação será removida e substituída no processamento do artigo. Em particular, não use as opções do processador de texto para justificar o texto ou hifenizar palavras. No entanto, use negrito, itálico, subscrito, sobrescrito etc. Ao preparar tabelas, se você estiver usando uma grade de tabela, use apenas uma grade para cada tabela individual e não uma grade para cada linha. Se nenhuma grade for usada, use tabulações, não espaços, para alinhar as colunas. O texto eletrônico deve ser preparado de maneira muito semelhante à dos manuscritos convencionais (consulte também o Guia para Publicação com a Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication> ). Observe que os arquivos de origem de figuras, tabelas e gráficos de texto serão necessários independentemente de você incorporar ou não suas figuras ao texto. Veja também a seção Arte eletrônica. Para evitar erros desnecessários, é altamente recomendável usar as funções de 'verificação ortográfica' e 'verificação gramatical' do seu processador de texto.

## **Estrutura do artigo**

### **Subdivisão - seções numeradas**

Divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas. As subseções devem ser numeradas 1.1 (então 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração da seção). Use esta numeração também para referências cruzadas internas: não se refira apenas ao 'texto'. Qualquer subseção pode receber um breve título. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

### **Introdução**

Indique os objetivos do trabalho e forneça uma fundamentação adequada, evitando um levantamento detalhado da literatura ou um resumo dos resultados.

### **Material e métodos**

Forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência. Se estiver citando diretamente de um método publicado anteriormente, use aspas e também cite a fonte. Quaisquer modificações nos métodos existentes também devem ser descritas.

### **Resultados**

Os resultados devem ser claros e concisos.

### **Discussão**

Deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção combinada de Resultados e Discussão costuma ser apropriada. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

### **Conclusões**

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma subseção de uma seção de Discussão ou Resultados e Discussão.

**Informações essenciais da página de título**  
**Título.**

Conciso e informativo. Os títulos são frequentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.

#### **Nomes e afiliações dos autores.**

Indique claramente o (s) nome (s) e sobrenome (s) de cada autor e verifique se todos os nomes foram digitados corretamente. Você pode adicionar seu nome entre parênteses em seu próprio script por trás da transliteração em inglês. Apresente os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra sobrescrita minúscula imediatamente após o nome do autor e na frente do endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.

#### **Autor para correspondência.**

Indique claramente quem tratará da correspondência em todas as fases da avaliação e publicação, também após a publicação. Esta responsabilidade inclui responder a quaisquer dúvidas futuras sobre Metodologia e Materiais. **Certifique-se de que o endereço de e-mail seja fornecido e que os dados de contato sejam mantidos atualizados pelo autor correspondente.**

#### **Endereço atual / permanente.**

Se um autor mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando na época, um 'endereço atual' (ou 'endereço permanente') pode ser indicado como uma nota de rodapé ao nome desse autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o endereço de afiliação principal. Números arábicos sobrescritos são usados para essas notas de rodapé.

#### **Destaques**

Os destaques são obrigatórios para este periódico, pois ajudam a aumentar a descoberta de seu artigo por meio de mecanismos de pesquisa. Eles consistem em uma pequena coleção de pontos que capturam os novos resultados de sua pesquisa, bem como novos métodos que foram usados durante o estudo (se houver). Por favor, dê uma olhada nos exemplos aqui: [destaques de exemplo](#) .



Os destaques devem ser enviados em um arquivo editável separado no sistema de submissão online. Use 'Destaques' no nome do arquivo e inclua de 3 a 5 marcadores (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por marcador).

### **Resumo**

É necessário um resumo conciso e factual. O resumo deve indicar resumidamente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. Um resumo geralmente é apresentado separadamente do artigo, portanto, deve ser capaz de ser independente. Por este motivo, referências bibliográficas devem ser evitadas, mas se for imprescindível citar o (s) autor (es) e ano (s). Além disso, abreviações não padronizadas ou incomuns devem ser evitadas, mas, se essenciais, devem ser definidas na primeira menção no próprio resumo.

### **Resumo**

### **gráfico**

Embora o *resumo* gráfico seja opcional, seu uso é incentivado, pois chama mais a atenção para o artigo online. O resumo gráfico deve resumir o conteúdo do artigo de forma concisa e pictórica, com o objetivo de captar a atenção de um grande número de leitores. Os resumos gráficos devem ser enviados como um arquivo separado no sistema de submissão online. Tamanho da imagem: forneça uma imagem com no mínimo  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser legível em um tamanho de  $5 \times 13$  cm usando uma resolução de tela regular de 96 dpi. Tipos de arquivo preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office. Você pode ver [exemplos de resumos gráficos](#) em nosso site de informações.

Os autores podem usar os [serviços de ilustração](#) da Elsevier para garantir a melhor apresentação de suas imagens e de acordo com todos os requisitos técnicos.

### **Palavras-chave**

Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 6 palavras-chave, usando a grafia americana e evitando termos gerais e plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Seja cauteloso com abreviaturas: apenas abreviações firmemente estabelecidas no campo podem ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação.

### **Agradecimentos**

Reúna os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de título, como nota de rodapé no título ou de outra

forma. Liste aqui as pessoas que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda com o idioma, assistência na redação ou leitura de revisão do artigo, etc.).

### **Formatação de fontes de financiamento**

Liste as *fontes de* financiamento desta forma padrão para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi financiado pelo National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; a Fundação Bill e Melinda Gates, Seattle, WA [número da concessão zzzz]; e os Institutos da Paz dos Estados Unidos [número do subsídio aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de bolsas e prêmios. Quando o financiamento vier de um subsídio em bloco ou outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhuma bolsa específica de agências de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

### **Unidades**

Siga as regras e convenções internacionalmente aceitas: use o sistema internacional de unidades (SI). Se outras unidades forem mencionadas, forneça seu equivalente em SI.

### **Nomenclatura**

Os autores e editores são, por acordo geral, obrigados a aceitar as regras que regem a nomenclatura biológica, conforme estabelecidas no Código Internacional de Nomenclatura Botânica, no Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias e no Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Os virologistas devem consultar o relatório mais recente do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus para obter a nomenclatura e a grafia corretas.

Todos os biotica (colheitas, plantas, insetos, pássaros, mamíferos, etc.) devem ser identificados por seus nomes científicos quando o termo em inglês é usado pela primeira vez, com exceção de animais domésticos comuns.

Todos os biocidas e outros compostos orgânicos devem ser identificados por seus nomes de Genebra quando usados pela primeira vez no texto. Os ingredientes ativos de todas as formulações devem ser identificados da mesma forma.

Para a nomenclatura química, as convenções da União Internacional de Química Pura e Aplicada e as recomendações oficiais da Comissão Combinada IUPAC-IUB de Nomenclatura Bioquímica devem ser seguidas.

### **Fórmulas**

Dê o significado de todos os símbolos imediatamente após a equação na qual eles foram usados pela primeira vez.

Para frações simples, use o solidus (/) em vez de uma linha horizontal.

As equações devem ser numeradas em série no lado direito entre parênteses. Em geral, apenas as equações explicitamente mencionadas no texto precisam ser numeradas.

O uso de potências fracionárias em vez de sinais de raiz é recomendado. As potências de e são freqüentemente mais convenientemente denotadas por exp.

Em fórmulas químicas, a valência de íons deve ser dada como, por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ , não como  $\text{Ca}^{++}$ .

Os números dos isótopos devem preceder os símbolos, por exemplo,  $^{18}\text{O}$ .

A escrita repetida de fórmulas químicas no texto deve ser evitada onde for razoavelmente possível; em vez disso, o nome do composto deve ser fornecido por extenso. Todavia, podem ser feitos no caso de um tempo muito longo nome que ocorre muito frequentemente ou, no caso de um composto a ser descrita como o produto final de uma determinação gravimétrica (por exemplo, fosfato de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### **Notas de rodapé**

As notas de rodapé devem ser usadas com moderação. Numere-os consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto podem incluir notas de rodapé no texto, e esse recurso pode ser usado. Caso contrário, indique a posição das notas de rodapé no texto e liste-as separadamente no final do artigo. Não inclua notas de rodapé na lista de referências.

### **Obra de arte**

#### **Manipulação**

**de**

**imagens**

Embora seja aceito que os autores às vezes precisam manipular imagens para fins de clareza, a manipulação para fins de engano ou fraude será vista como abuso ético científico e será tratada de acordo. Para imagens gráficas, este periódico está aplicando a seguinte política: nenhum recurso específico em uma imagem pode ser aprimorado, obscurecido, movido, removido ou introduzido. Ajustes de brilho, contraste ou equilíbrio de cores são aceitáveis se

e desde que não obscureçam ou eliminem qualquer informação presente no original. Ajustes não lineares (por exemplo, alterações nas configurações de gama) devem ser divulgados na legenda da figura.

## Arte

## eletrônica

### Pontos

### gerais

- Certifique-se de usar letras e tamanhos uniformes para a arte original.
- Incorpore as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
- Procure usar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes que sejam semelhantes.
- Numere as ilustrações de acordo com sua seqüência no texto.
- Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de arte.
- Forneça legendas para as ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações próximo às dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.
- Certifique-se de que as imagens coloridas sejam acessíveis a todos, incluindo aqueles com visão de cores prejudicada.

## Formatos

Se sua arte eletrônica for criada em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), forneça "no estado em que se encontra" no formato de documento nativo. Independentemente do aplicativo usado diferente do Microsoft Office, quando sua arte eletrônica for finalizada, 'Salvar como' ou converta as imagens para um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos de linha, meios-tons e combinações de linha / meio-tons fornecidos abaixo):

EPS (ou PDF): Desenhos vetoriais, incorpora todas as fontes usadas.

TIFF (ou JPEG): Fotografias coloridas ou em escala de cinza (meios-tons), com um mínimo de 300 dpi.

TIFF (ou JPEG): Desenhos de linha em bitmap (pixels puros em preto e branco), com um mínimo de 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): Combinações de linha de bitmap / meio-tons (colorido ou escala de cinza), mantendo um mínimo de 500 dpi.

## Não:

- Forneça arquivos otimizados para uso na tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); estes normalmente têm um baixo número de pixels e um conjunto limitado de cores;
- Forneça arquivos com resolução muito baixa;
- Envie gráficos desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

## **Arte**

## **colorida**

Certifique-se de que os arquivos de arte estejam em um formato aceitável (TIFF (ou JPEG), EPS (ou PDF) ou arquivos do MS Office) e com a resolução correta. Se, junto com seu artigo aceito, você enviar figuras coloridas utilizáveis, a Elsevier garantirá, sem nenhum custo adicional, que essas figuras aparecerão em cores online (por exemplo, ScienceDirect e outros sites), além da reprodução em cores na impressão.

## **Serviços**

## **de**

## **ilustração**

Elsevier's Author Services oferece serviços de ilustração para autores que se preparam para enviar um manuscrito, mas preocupados com a qualidade das imagens que acompanham seu artigo. Os ilustradores especialistas da Elsevier podem produzir imagens científicas, técnicas e de estilo médico, bem como uma gama completa de tabelas, tabelas e gráficos. O 'polimento' de imagens também está disponível, onde nossos ilustradores pegam sua (s) imagem (ns) e as aprimoram para um padrão profissional. Visite o site para saber mais.

## **Legendas**

## **das**

## **figuras**

Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Forneça as legendas separadamente, não anexadas à figura. A legenda deve conter um breve título ( **não** na própria figura) e uma descrição da ilustração. Reduza o texto nas próprias ilustrações, mas explique todos os símbolos e abreviações usados.

## **Tabelas**

Envie as tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em página (s) separada (s) no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela. Seja cauteloso no uso de tabelas e assegure-se de que os dados nelas apresentados não duplicem os resultados descritos em outra parte do artigo. Evite usar régua verticais e sombreamento nas células da tabela.

## **Referências**

### **Citação no texto**

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referências (e vice-versa). Quaisquer referências citadas no resumo devem ser fornecidas por extenso. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências estiverem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão do periódico e devem incluir uma substituição da data de publicação por 'Resultados não publicados' ou 'Comunicação pessoal'. A citação de uma referência como 'no prelo' implica que o item foi aceito para publicação.

### **Referências da Web**

No mínimo, o URL completo deve ser fornecido e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Quaisquer informações adicionais, se conhecidas (DOI, nomes dos autores, datas, referência a uma publicação fonte, etc.), também devem ser fornecidas. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um título diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referências.

### **Referências de dados**

Este periódico encoraja você a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito, citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua Lista de referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor (es), título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente global. Adicione [dataset] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo corretamente como uma referência de dados. O identificador [dataset] não aparecerá em seu artigo publicado.

### **Referências em uma edição especial**

Certifique-se de que as palavras 'esta edição' sejam adicionadas a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) para outros artigos na mesma edição especial.

### **Software de gerenciamento de referência**

A maioria dos periódicos da Elsevier tem seu modelo de referência disponível em muitos dos produtos de software de gerenciamento de referência mais populares. Isso inclui todos os

produtos que suportam estilos de Citation Style Language , como Mendeley . Usando plug-ins de citação desses produtos, os autores só precisam selecionar o modelo de periódico apropriado ao preparar seu artigo, após o qual as citações e bibliografias serão formatadas automaticamente no estilo do periódico. Se ainda não houver um modelo disponível para este periódico, siga o formato das referências e citações de amostra, conforme mostrado neste Guia. Se você usar um software de gerenciamento de referência, certifique-se de remover todos os códigos de campo antes de enviar o manuscrito eletrônico.

### **Estilo de referência**

*Texto:* indica as referências por número (s) entre colchetes de acordo com o texto. Os autores reais podem ser citados, mas o (s) número (s) de referência sempre devem ser fornecidos.

*Lista:* Numere as referências (números entre colchetes) na lista na ordem em que aparecem no texto.

*Exemplos:*

Referência a uma publicação de jornal:

[1] Papa FO, Melo CM, Monteiro GA, Papa PM, Guasti PN, Maziero RRD, et al. Correção da conformação perineal e vulvar equina usando uma modificação da técnica de Pouret. *J Equine Vet Sci* 2014; 34: 459–64.

Referência a um livro:

[2] Strunk Jr W, White EB. *Os elementos de estilo*. 4ª ed. Nova York: Longman; 2000.

Referência a um capítulo em um livro editado:

[3] Mettam GR, Adams LB. Como preparar uma versão eletrônica de seu artigo. In: Jones BS, Smith RZ, editores. *Introdução à era eletrônica*, Nova York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Observe o formato abreviado para o número da última página. por exemplo, 51–9, e que para mais de 6 autores os primeiros 6 devem ser listados seguidos por 'et al.' Para obter mais detalhes, consulte 'Requisitos uniformes para manuscritos submetidos a revistas biomédicas' (*J Am Med Assoc* 1997; 277: 927–34) (consulte também [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) )

Referência a um conjunto de dados:

[4] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Dados de mortalidade para a doença da murcha do carvalho japonês e composições da floresta circundante, *Mendeley Data*, v1; 2015

### **Origem das abreviações de periódicos**

Os nomes de periódicos devem ser abreviados de acordo com a List of Title Word Abbreviations.

### **Visualização de dados**

Inclui visualizações de dados interativas em sua publicação e permite que seus leitores interajam e se envolvam mais de perto com sua pesquisa. Siga as instruções [aqui](#) para saber mais sobre as opções de visualização de dados disponíveis e como incluí-las em seu artigo.

### **Material suplementar Material**

suplementar, como aplicativos, imagens e clipes de som, pode ser publicado com seu artigo para aprimorá-lo. Os itens suplementares enviados são publicados exatamente como são recebidos (os arquivos Excel ou PowerPoint aparecerão como tal online). Envie seu material junto com o artigo e forneça uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo suplementar. Se você deseja fazer alterações no material suplementar durante qualquer estágio do processo, certifique-se de fornecer um arquivo atualizado. Não anote nenhuma correção em uma versão anterior. Desative a opção 'Rastrear alterações' nos arquivos do Microsoft Office, pois eles aparecerão na versão publicada.

### **Dados de pesquisa**

Este periódico incentiva e permite que você compartilhe dados que apóiam a publicação de sua pesquisa quando apropriado e permite que você interligue os dados com seus artigos publicados. Os dados de pesquisa referem-se aos resultados de observações ou experimentações que validam os resultados da pesquisa. Para facilitar a reprodutibilidade e a reutilização de dados, esta revista também incentiva você a compartilhar seu software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados ao projeto.

Abaixo estão algumas maneiras pelas quais você pode associar dados a seu artigo ou fazer uma declaração sobre a disponibilidade de seus dados ao enviar seu manuscrito. Se você está compartilhando dados de uma dessas maneiras, você é encorajado a citar os dados em seu manuscrito e lista de referências. Consulte a seção "Referências" para obter mais informações sobre a citação de dados. Para obter mais informações sobre como depositar, compartilhar e usar dados de pesquisa e outros materiais de pesquisa relevantes, visite a página de [dados de pesquisa](#).



## **Vinculação de dados**

Se você disponibilizou os dados de sua pesquisa em um repositório de dados, pode vincular seu artigo diretamente ao conjunto de dados. A Elsevier colabora com vários repositórios para vincular artigos no ScienceDirect a repositórios relevantes, dando aos leitores acesso aos dados subjacentes que lhes dão uma melhor compreensão da pesquisa descrita.

Existem diferentes maneiras de vincular seus conjuntos de dados ao seu artigo. Quando disponível, você pode vincular diretamente seu conjunto de dados ao seu artigo, fornecendo as informações relevantes no sistema de submissão. Para obter mais informações, visite a [página de vinculação do banco de dados](#).

Para [repositórios de dados suportados](#), um banner de repositório aparecerá automaticamente ao lado do seu artigo publicado no ScienceDirect.

Além disso, você pode vincular a dados ou entidades relevantes por meio de identificadores no texto de seu manuscrito, usando o seguinte formato: Banco de dados: xxxx (por exemplo, TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

## **Mendeley Data**

Este jornal oferece suporte a Mendeley Data, permitindo que você deposite quaisquer dados de pesquisa (incluindo dados brutos e processados, vídeo, código, software, algoritmos, protocolos e métodos) associados ao seu manuscrito em um repositório de acesso aberto e gratuito. Durante o processo de submissão, após enviar seu manuscrito, você terá a oportunidade de enviar seus conjuntos de dados relevantes diretamente para o *Mendeley Data*. Os conjuntos de dados serão listados e diretamente acessíveis aos leitores ao lado do seu artigo publicado online.

Para obter mais informações, visite a página [Mendeley Data for journals](#).

## **Declaração de dados**

Para promover a transparência, encorajamos você a declarar a disponibilidade de seus dados em seu envio. Isso pode ser um requisito do seu órgão de financiamento ou instituição. Se seus dados não estiverem disponíveis para acesso ou inadequados para postagem, você terá a oportunidade de indicar o motivo durante o processo de envio, por exemplo, declarando que os dados da pesquisa são confidenciais. A declaração aparecerá com seu artigo publicado no ScienceDirect. Para obter mais informações, visite a [página Declaração de dados](#).

## **Correção de prova online**

Para garantir um processo rápido de publicação do artigo, pedimos aos autores que nos forneçam suas correções de prova em dois dias. Os autores para correspondência receberão um e-mail com um link para nosso sistema de revisão online, permitindo a anotação e correção das provas online. O ambiente é parecido com o do MS Word: além de editar o texto, você também pode comentar figuras / tabelas e esclarecer dúvidas no Editor de Texto. A revisão baseada na Web fornece um processo mais rápido e menos sujeito a erros, permitindo que você digite diretamente suas correções, eliminando a introdução potencial de erros. Se preferir, você ainda pode escolher anotar e fazer upload de suas edições na versão em PDF. Todas as instruções de revisão serão fornecidas no e-mail que enviamos aos autores, incluindo métodos alternativos à versão online e PDF. Faremos todo o possível para que seu artigo seja publicado com rapidez e precisão. Use esta prova apenas para verificar a composição, edição, completude e correção do texto, tabelas e figuras. Alterações significativas no artigo aceito para publicação somente serão consideradas nesta etapa com a permissão do Editor. É importante garantir que todas as correções sejam enviadas de volta para nós em uma comunicação. Verifique cuidadosamente antes de responder, pois a inclusão de quaisquer correções subsequentes não pode ser garantida. A revisão é exclusivamente sua responsabilidade.

### **Offprints**

O autor correspondente receberá, sem nenhum custo, um link de compartilhamento personalizado fornecendo 50 dias de acesso gratuito à versão final publicada do artigo no ScienceDirect. O link de compartilhamento pode ser usado para compartilhar o artigo por meio de qualquer canal de comunicação, incluindo e-mail e mídia social. Por uma taxa extra, separações em papel podem ser solicitadas por meio do formulário de pedido de cópias impressas, que é enviado assim que o artigo é aceito para publicação. Os correspondentes e co-autores podem solicitar separatas a qualquer momento por meio dos Serviços de Autor da Elsevier. Os autores correspondentes que publicaram seu artigo com acesso aberto ouro não recebem um link de compartilhamento, pois sua versão final publicada do artigo está disponível em acesso aberto no ScienceDirect e pode ser compartilhada através do link do artigo DOI.