

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL COM A  
CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE CÃES**

Laíza Sartori de Camargo

BOTUCATU- SÃO PAULO  
FEVEREIRO/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

## **CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE CÃES**

LAÍZA SARTORI DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus  
de Botucatu, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Animal

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira  
de Souza

BOTUCATU- SÃO PAULO  
FEVEREIRO/2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Camargo, Laíza Sartori de.

Correlação das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de cães / Laíza Sartori de Camargo. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Cães - Reprodução. 2. Espectrometria de massa.  
3. Espermatozoides. 4. Plasma seminal. 5. Criopreservação.  
6. Sêmen.

Palavras-chave: Canino; Espectrometria de massa; Espermatozoide.

Nome do autor (a): Laíza Sartori de Camargo

Título: CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE CÃES

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP  
- Botucatu /SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP  
- Botucatu /SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Mello Martins

Membro

Teriogenologia de Animais de Companhia, Departamento de Clínicas Veterinárias, UEL, Londrina/PR

Data da Defesa: 21 de fevereiro de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao Espírito Santo, por terem me guiado durante toda esta caminhada e me dado força, garra e persistência para trilhá-la.

Aos meus pais, João e Sirlei, por serem meu porto seguro, meus grandes incentivadores de todos os projetos que propus realizar, por mais dispendiosos que fossem, sempre acreditaram em mim. Sem eles, com absoluta certeza, esta história não estaria sendo construída.

Ao meu irmão, Eduardo, meu maior orgulho, meu espelho do sucesso, obrigada por colocar em prática o significado da palavra irmão.

Ao meu companheiro, amigo e namorado, Otávio, por me apoiar em todas as minhas aventuras, por ser calmo quando eu mais precisei, por saber ouvir e respeitar. Com você aprendi a crescer, errar, amadurecer e *amar*.

Agradeço a minha orientadora, Fabiana, que está comigo há 9 anos, ao meu lado, sendo mais que a “Chefa”, sendo amiga e mentora em todos os momentos. Meu respeito e admiração sempre foi imensurável e meu aprendizado com você é diário. Muito obrigada por ter se tornado parte e história da minha vida.

Agradeço a banca examinadora do exame de qualificação, Priscilla e Camila, por participarem de forma integral e efetiva desde o início da realização deste projeto.

Aos meus amigos que estiveram comigo, também, dentro do laboratório: Caroline Scott, Cristiane (Kit), Edjalma, Gabriel (Charolês), Priscilla, Rubia, muito obrigada por todos os ensinamentos, risadas, choros, confissões e broncas, com vocês eu aprendi que nada se faz sozinho, que sempre podemos ser melhores juntos. Esse mestrado é de todos vocês, também.

A toda equipe de (amigos) pós-graduandos envolvida, que esteve sempre comigo com muito entusiasmo e carinho, a Vivi Codognoto, Michelle, Paulo Yamada, Daniel, Viviane Vallejo, Guta, Carmen, Caroline Serrano, Junior e Thaís.

Um agradecimento especial ao Professor Frederico Papa, Prof<sup>a</sup> Eunice Oba, Prof<sup>a</sup> Fernanda, Prof<sup>a</sup> Denise e Camila Dell’Aqua, por toda disposição em ensinar, ajudar em todas as dificuldades encontradas e em ceder os laboratórios

para realização desse (s) projeto (s).

Meu muito obrigada a minha companheirinha, Link, de 16 anos, que me ensinou o que é amor incondicional, respeito, rotina e como é fugaz e ao mesmo tempo sábio, o ciclo da vida. Sem me esquecer, do meu outro 'irmão', Leco, esse sim conhece o significado da palavra felicidade. O respeito por vocês eu carrego em minha vida e profissão.

Agradeço a todos os animais e proprietários que colaboraram de forma inestimável com este projeto, com meu crescimento pessoal e profissional.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro (2015/05353-4) e por tornar possível a realização desse trabalho.

*“Caminhante não há caminho. Se faz caminho ao andar...”*

*Antônio Machado*

## ABREVIATURAS

ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça (mm)

ANOVA = análise de variância

ASH = albumina sérica humana

BCF = frequência de batimento da cabeça ou batimento flagelar (Hz)

CASA = computer-aided semen analyzer

CPSE = arginine esterase

*Cluster 1 = Cluster M*

*Cluster 2 = Cluster H*

*Cluster 3 = Cluster L*

DMSO = Dimetilsulfóxido

FITC-PSA = aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína

HMP = alto potencial mitocondrial (%)

IND MOV = Índice de movimento

IND VEL = Índice de velocidade

JC-1 = 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide

LIN = coeficiente linear (%)

LMP = baixo potencial mitocondrial (%)

MMP = médio potencial mitocondrial (%)

MP = motilidade progressiva (%)

MPAI = membrana plasmática e acrossomal íntegras (%)

MPAL = membrana plasmática e acrossomal lesadas (%)

MPIAL = membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (%)

MPLAI = membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (%)

MT = motilidade total (%)

PCA = componente principal

VCL = velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )

VSL = velocidade linear ( $\mu\text{m/s}$ )

TL = teste de ligação

ELON = *elongation*

## SUMÁRIO

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| <b>CAPÍTULO 1</b>                                              | 1  |
| <b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>                           | 3  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>                                | 4  |
| 2.1. Análise de sêmen                                          | 4  |
| 2.3. Criopreservação do sêmen canino                           | 9  |
| 2.6. Proteínas do plasma seminal <i>versus</i> congelabilidade | 10 |
| 2.5. Proteínas do plasma seminal <i>versus</i> fertilidade     | 12 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                             | 15 |
| <b>CAPÍTULO 2</b>                                              | 32 |
| <b>ARTIGO I</b>                                                | 33 |
| <b>RESUMO</b>                                                  | 33 |
| <b>ABSTRACT</b>                                                | 34 |
| <b>1. Introdução</b>                                           | 35 |
| <b>2. Material e Métodos</b>                                   | 35 |
| 2.1. Reagentes                                                 | 36 |
| 2.2. Aspectos éticos                                           | 36 |
| 2.3. Animais e colheita do sêmen                               | 36 |
| 2.4. Preparação das amostras                                   | 36 |
| 2.5. Citometria de fluxo                                       | 37 |
| 2.6. Análise estatística                                       | 37 |
| <b>3. Resultados</b>                                           | 38 |
| <b>4. Discussão</b>                                            | 40 |
| <b>Referências</b>                                             | 42 |
| <b>CAPÍTULO 3</b>                                              | 45 |
| <b>ARTIGO II</b>                                               | 45 |
| <b>RESUMO</b>                                                  | 45 |
| <b>CONTENTS</b>                                                | 46 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                            | 47 |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>                                    | 48 |
| 2.1. Animais e colheita do sêmen                               | 48 |
| 2.2 Colheita e avaliação                                       | 48 |

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| 2.3. Congelação e descongelação do sêmen ..... | 51        |
| 2.4. Proteínas do plasma seminal.....          | 52        |
| 2.5. Análise estatística .....                 | 54        |
| <b>4 RESULTADOS .....</b>                      | <b>55</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>                       | <b>66</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES .....</b>                      | <b>71</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS .....</b>                     | <b>82</b> |

## RESUMO

CAMARGO, L.S. CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE CÃES. Botucatu – SP. 2017. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os objetivos deste estudo foram validar a sonda fluorescente (*MitoStatus Red*) para análise de potencial mitocondrial em espermatozoide de cães por citometria de fluxo, associada a análise de integridade de membrana plasmática e do acrossomo (experimento I). Além disso, foi conduzida análise proteômica (abordagem *shotgun*) do plasma seminal de cães, sua correlação com a congelabilidade do sêmen e capacidade de ligação das células espermáticas em membrana perivitelina da gema de ovo (TL) (experimento II). No experimento I foram utilizados 10 ejaculados, com motilidade espermática >75% e as concentrações de 20 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM da sonda *MitoStatus Red* foram comparadas na citometria de fluxo. Concluiu-se que 20 nM foi a concentração ideal, sem danos as estruturas celulares. No experimento II foram utilizados 10 animais, 2 ejaculados/animal (n = 20). Os ejaculados foram avaliados por cinética espermática, citometria de fluxo (potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e de acrossomo) e TL. A análise proteômica do plasma seminal foi avaliada por espectrometria de massas. Os ejaculados foram divididos em 3 *clusters* (*cluster* Low, *cluster* Medium, *cluster* Hight) de acordo com os parâmetros espermáticos pré e pós-descongelção. Os grupos foram correlacionados com as proteínas encontradas no plasma seminal. Concluiu-se que existe relação entre presença ou ausência de proteínas do plasma seminal de acordo com a qualidade espermática.

**Palavras-chave:** Canino, Citometria de fluxo, Spermatozoa, Espectometria de massa.

## **ABSTRACT**

CAMARGO, L.S. CORRELATION OF SEMINAL PLASMA PROTEINS AND THE DOGS SEMEN FREEZABILITY. Botucatu – SP. 2017. 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Canine reproduction studies are important because of its closeness with human reproductive physiology, and it's the main experimental model for wild species. The lack of studies in canine reproduction of stray animals, is an important tool for the alternative birth control methods researches, is another relevant reason to study reproduction in this species. In order to find fertility or infertility markers, seminal plasma and/or sperm proteins have already been the subject of studies in many other species with different approaches and applications. In farm animals, these proteins have been studied in order to elucidate spermatogenesis physiological events, sperm maturation, fertilization and cell changes when subjected to cryopreservation. Thus, those studies have produced results that can be used to identify animals with higher or lower fertility and freezability. In this sense, and in view of the importance of the dog as experimental model, and because seminal plasma proteins can increase the resistance of sperm cell in front of the cryopreservation process is believed that the identification of the freezability markers, in this species, can generate results applicable to other canids contributing to the formation of germplasm banks. In this way, the aim of this study was to correlate the semen quality and sperm cells binding capacity to the perivitelline egg yolk membrane, pre and post-freezing, with the seminal plasma protein analysis using shotgun approach.

**Keywords:** Mass Spectrometry, Flow Citometry, Canine, Semen Spermatozoa

# **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos houve avanços nas pesquisas relacionadas às biotécnicas reprodutivas em cães. No entanto, está aquém quando comparado às outras espécies, como bovinos, equinos e humanos.

O cão é uma espécie correlata à humana e possui como única glândula sexual acessória a próstata, desta forma estudos relacionados a composição do plasma seminal tem focado a investigação de alterações prostáticas.

Para que se tenha melhor compreensão dos processos envolvidos durante a criopreservação são necessários estudos aprofundados dos efeitos da baixa temperatura sob a célula espermática, ação do plasma seminal e das proteínas presentes na membrana do espermatozoide e plasma seminal.

Desse modo, deve haver a avaliação detalhada do ejaculado, desde a motilidade, vigor, viabilidade espermática e testes de fertilidade in vitro. Além disso, técnicas de biologia molecular, como análise proteômica podem ser incluídas no estudo da fisiologia espermática e do trato reprodutor masculino.

As proteínas são consideradas as principais macromoléculas envolvidas na fertilidade, seja na capacitação, na reação do acrossomo, assim como na ligação entre os gametas, além de estarem envolvidas diretamente nos processos de criopreservação e fertilização. Essas também estão envolvidas no processo de congelamento, pois cerca de 35% das proteínas são aderidas ao espermatozoide durante a ejaculação, atuando no momento da criopreservação espermática.

Dessa forma, esta revisão tem por objetivo descrever os principais estudos relacionados à análise proteômica do plasma seminal, correlação com a criopreservação, ressaltar a importância das análises de cinética espermática, integridade de membrana plasmática, do acrossomo e potencial mitocondrial nos espermatozoides de cães.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Análise de sêmen

A análise do sêmen de cães é rotineiramente feita por meio da avaliação de motilidade, concentração, morfologia (KORDAN et al., 2013). A motilidade, quando possível, é realizada pelo sistema de análise espermática computadorizada (CASA) (MORTINER, 1997).

O sistema CASA é utilizado em conjunto com a citometria de fluxo, a qual tem sido ferramenta presente nas pesquisas com reprodução, e está sendo utilizado sondas fluorescentes específicas para cada análise (RIJSSELAERE et al., 2005; RIJSSELAERE et al., 2012).

A criopreservação pode alterar a motilidade espermática, por meio do estresse oxidativo em que a célula espermática é submetida, que também causará danos as membranas plasmáticas e acrossomol (AITKEN et al., 1991). A membrana plasmática permite comunicação com o meio externo, favorece que entre em contato com o plasma seminal, sofrendo remodelamento da membrana e o espermatozoide é armazenado na cauda do epidídimo (AMAN; HAMMERSTEDT, 1993; LEAHY; GADELLA, 2011).

Durante a criopreservação há alterações nas estruturas de membrana plasmática e acrossomo, devido a mudanças na camada lipídica e fluidez de membrana (CASTRO et al., 2016). Este processo gera estresse oxidativo a célula, que causará alterações as essas estruturas e, como consequência, falha na fertilidade (TAVILANI et al., 2007).

Para observação da ocorrência de injúrias a membrana plasmática, utiliza-se com maior frequência a sonda fluorescente chamada iodeto de propídeo, a qual se liga ao DNA do espermatozoide com membrana lesada (GRAHAM et al., 1990).

Para reação acrossomal, é mais comumente utilizado a sonda fluorescente FITC-PSA, *pisum sativum* agglutinin, são marcadores de glicoproteínas, sendo o PSA uma aglutinina de ervilha que se liga ao acrossomo (CROSS; MEIZEL, 1989; GRAHAM et al., 1990, FARLIN et al., 1992), ou FITC-PNA, *Arachis hypogea agglutinin* (CHENG et al., 1996).

A perda do potencial mitocondrial durante a criopreservação pode estar

relacionada a ação do crioprotetor, sendo o glicerol o mais comumente utilizados na espécie canina, o qual promove, também, estresse osmótico e formação de radicais livres (LUCIO et al., 2016). Neste mesmo estudo, a queda do potencial mitocondrial em amostras descongeladas foi relacionada a formação de cristais de gelo intracelulares, os quais alteram o metabolismo celular, interferindo de forma negativo na produção energética e formação de ATPs (LUCIO et al., 2016).

Para análise do potencial desta organela, pode-se utilizar sondas fluorescentes como *MitoTracker green* (GARNER et al., 1997), amplamente utilizada na avaliação de células criopreservadas; Rodamine 123 (BENEL, 1986), a qual é capaz de analisar a mitocôndria funcional (SALVIOLI., 1997); J-agregados, mais conhecido por JC-1, que diferentemente da Rodamine, é possível corar várias classes de potenciais mitocondriais (REERS et al., 1991).

Em humanos já foi investigado a relação entre defeitos da mitocôndria com a queda de motilidade, devido a eficiência e ao consumo de oxigênio, além de ter capacidade de gerar ATP, por meio da fosforização oxidativa. Também está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio, apoptose, sinalização de cálcio. (PELLICCIONE et al., 2011; GREEN et al., 2011; PIOMBONI et al., 2012).

Além das análises de cinética espermática e citometria de fluxo, é possível realizar o teste de ligação do espermatozoide em membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha (TL), o qual simula a ligação do espermatozoide a zona pelúcida do ovócito (BARBATO et al., 1998). Este teste é de importante relevância, visto que a interação entre espermatozoide e zona pelúcida é etapa fundamental no processo de fertilização (HOLST et al., 2000b).

Com o objetivo de complementar a análise espermática *in vitro*, o teste de ligação (TL) é ferramenta de baixo custo, com alta repetibilidade em um curto período de tempo (CRISCUOLO et al., 2010). Assim como outros ensaios *in vitro*, estes permitem avaliar o impacto da congelação e refrigeração sobre o espermatozoide e injúrias em amostras a fresco (HAY et al., 1997; HOLST et al., 2000a).

O TL já foi realizado em outras espécies, como equinos, caprinos, bovinos, humanos e suínos (BARBATO et al., 1998; AMANN et al., 1999; SANTOS., 2010; CORCINI et al., 2012), devido a similaridade da composição

glicoproteica da membrana da gema do ovo com a zona pelúcida de ovócitos de mamíferos (WACLAWEK et al, 1998; BARBATO et al, 1998). Sendo relacionado a capacidade do espermatozoide de se ligar a membrana da gema de ovo aos índices de fertilização *in vivo* (BARBATO et al., 1998). A fim de realizar o TL, é necessário que se tenha uma população heterogênea de espermatozoides, assim como ocorre em um ejaculado, com presença de células com defeitos flagelar, ausência de acrossomo, o que pode resultar na infertilidade (HOLT; VAN LOOK, 2004).

Além do TL, outra alternativa para verificar a capacidade de ligação dos espermatozoides, é a interação dos espermatozoides a zona pelúcida de ovócitos, já foi utilizado para avaliação das ligações dos espermatozoides em bovinos, equinos e suínos (FAZELI et al., 1993a; FAZELI et al., 1993b, FAZELI et al., 1995), em cães é descrito desde 1997 (HAY et al., 1997) todavia, a desvantagem deste teste é que pode haver a influência de condições *in vitro* e a variabilidade dos ovócitos (GRACZYKOWSKI et al., 1998).

Em contrapartida, é necessária a incubação dos ovócitos com os espermatozoides em um período de 18 horas (HOLST et al., 2000a), sendo uma avaliação laboriosa, pois os ovócitos são obtidos após a ovariectomia e o número de células recuperadas é variável entre fêmeas (HOLST et al., 2000a). O processamento dos ovários deve ser feito em intervalo curto, posterior a castração, visto que o armazenamento dos ovários (1 dia até uma semana), pode ser prejudicial para a recuperação dos ovócitos (HOLST et al., 2000b).

Porém, esses ensaios em laboratório estão aquém daqueles realizados *in vivo*, nenhum teste ainda é capaz de mimetizar de forma segura as complexas interações que ocorrem durante todo o processo entre o espermatozoide e o trajeto na fêmea (LARSSON; RODRÍGUEZ- MARTÍNEZ, 2000).

Há a possibilidade de realizar a inseminação artificial, para teste de fertilização *in vivo*, porém a desvantagem deste teste é a restrição de machos utilizados, custo superior da técnica, uso de um grande número de fêmeas em estro (LARSSON; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000), assim como a necessidade de um endoscópio para a realização da inseminação intravaginal e ultrassom para acompanhamento das fêmeas inseminadas.

Em cães, os fatores que estão relacionados a infertilidade ainda não estão completamente elucidados, como em humanos (KUSTRITZ, 2007).

Desta forma, para que ocorra a singamia, o espermatozoide deve ter todas essas funções ocorrendo de forma correta e em sincronia, qualquer falha pode gerar como consequência a infertilidade (AMAN; HAMMERSTEDT, 1993; HOLT; VAN LOOK, 2004). Sendo assim, o objetivo final de todas as avaliações do sêmen é prever a fertilidade de um macho utilizado na reprodução (PENÃ-MARTINEZ, 2004).

## **2.4. Plasma seminal**

Em cães, a glândula acessória responsável pela secreção do plasma seminal é a próstata (JOHNSTON et al., 2001), este fluido constitui 90% do ejaculado de cães (HEWITT, 2001). O plasma seminal é o conjunto de secreção da glândula prostática e do epidídimo (BURROUGHS et al., 2013).

O plasma seminal tem como função transporte de espermatozoides, possui constituintes que protegem seu metabolismo, atua na maturação final espermática por meio de processos hormonais e enzimáticos (MANN, 1978), ajudam a manter na motilidade e é componente importante na prepação da célula para o momento da fertilização (STRZEŻEZ; FRASER, 2011; MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA et al., 2015b)

O ejaculado do cão é dividido em 3 frações, sendo a primeira e terceira, de origem prostática, e a segunda, rica em espermatozoides (ENGLAND et al., 1990; JOHNSTON, 2001).

É possível que a próstata tenha efeito distinto sobre os espermatozoides na espécie canina, visto que há uma concentração menor de açúcares, que afeta o metabolismo, capacidade de sobrevivência e motilidade da célula espermática, quando comparados a outras espécies que possuem mais de uma glândula acessória (BRANAM et al., 1984; AQUINO-CORTEZ et al., 2016).

No plasma seminal estão presentes espermatozoides, cálcio, ácido cítrico, células prostáticas e do epidídimo, proteínas de ligação aos fosfolipídios e íons (BRANAM et al., 1984), enzimas que protegem e auxiliam na motilidade dos espermatozoides, em sua sobrevivência e capacitação (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011; KOROCHKINA et al., 2014).

A próstata na espécie canina é responsável por secretar aproximadamente 90% de arginina esterase, por meio das células epiteliais

prostáticas, fosfatase alcalina/ácida, sendo os principais biomarcadores de hiperplasia benigna prostática, azoospermia do sistema reprodutor em cães (CHAPDELAINE et al., 1984; CARDILLI; MOSTACHIO, 2015).

A arginina esterase, conhecida como proteína específica prostática canina (CPSE), pertencente à família das calicreínas, foi considerada um marcador imunológico específico da glândula normal ou hiperplásica (DUBÉ et al., 1986; McENTEE et al., 1987). A CPSE aumenta em animais que apresentam hiperplasia prostática benigna, prostatite por bactéria, e carcinoma prostático (KLAUNSNER et al., 1995) e pode reduzir por meio de castração química, cirúrgica ou andrógenos exógenos (FRENETTE et al., 1985; ISAACS et al., 1985). FRENETTE et al. (1985) sugeriram que o possível alvo da CPSE é a cauda do espermatozoide, no qual a enzima já foi detectada por imunofluorescência.

Em humanos, a fosfatase ácida e o antígeno específico da próstata (PSA) são fatores prognóstico e diagnóstico de carcinoma prostático, no cão há controvérsias sobre essas avaliações e dosagens (BELL et al., 1995, GOBELLO et al., 2002). No entanto, em cães a fosfatase alcalina e a carnitina são utilizadas em animais que apresentam azoospermia e oligospermia, sendo um marcador de obstrução epididimal (OLSON et al., 1987). A fosfatase alcalina já foi correlacionada de maneira positiva com a concentração espermática, em animais normospermicos (MOLLO et al., 1997).

Em meados dos anos 70 foi descoberto que as células epiteliais da próstata secretam em grande quantidade vesículas chamadas prostassomos ou vesículas extracelulares, com altas concentrações de diferentes lipídeos, proteínas, contendo RNA e DNA (RONQUIST; HEDSTROM, 1977; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; JODAR et al., 2016). Sua função no plasma seminal de cães ainda é pouco conhecida, no entanto descobriu-se que os prostassomos podem melhorar a motilidade espermática nesta espécie quando adicionado ao ejaculado (MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA et al., 2015a).

Os primeiros estudos com análise e separação proteica se iniciaram por volta de 1950 (LARSON; SALISBURY, 1954) e hoje, um dos principais objetivos de se estudar e identificar os componentes presentes no plasma seminal em cães é que estas proteínas podem ser biomarcadores e são utilizados, com frequência, na medicina humana no diagnóstico e prognóstico de doenças do

trato reprodutivo (AQUINO-CORTEZ et al., 2016).

Em humanos a fisiopatologia da próstata e seus marcadores estão mais estabelecidos e elucidados do que em cães. Dessa forma, estudos mais aprofundados são necessários para a compreensão dos processos fisiológicos reprodutivos na espécie canina, assim como a atuação das proteínas do plasma seminal sob o espermatozoide, e a relação entre as duas espécies se torna fundamental para essa investigação sobre o assunto.

### **2.3. Criopreservação do sêmen canino**

Os primeiros estudos com armazenamento de sêmen e refrigeração foi por volta de 1954 (HARROP et al., 1954) e, atualmente, a criopreservação de sêmen é utilizada na espécie canina com o intuito de manter conservada a variabilidade genética por tempo indeterminado, sobretudo em espécies selvagens (PRAPAIWAN et al., 2016), assim como possibilita o transporte de células a grandes distâncias (GAO; CRITSER, 2010; CASTRO et al., 2016).

O sêmen de cães é estável à refrigeração e armazenamento até 48 horas a 4°C (PENA et al., 2006), no entanto a criopreservação, é um processo mais complexo que envolve maior degradação da célula (FARSTAD, 1996).

O diluente mais amplamente utilizado é o Tris gema de ovo (LINDEFORSBERG, 2014), formado, entre outros compostos, de crioprotetor, sendo o glicerol o mais utilizado em cães (MARTINS-BESSA et al., 2006). Porém esse pode interferir na formação ATP na célula, causando desequilíbrio, pois atua na bomba de íons (HAMMERSTEDT et al., 1990) e modifica a permeabilidade da água (ROTA et al., 2006).

O processo de criopreservação pode levar a diminuição da motilidade (ALHAIDER; WATSON, 2009), causar injúrias em mitocôndrias, mudanças na fluidez de membranas a partir de alterações dos fosfolipídios (SION et al., 2004; CASTRO et al., 2016), danos a cromatina, enzimas e DNA (CASTRO et al., 2016). Além disso, há o estresse mecânico da congelação e descongelação, por meio da formação de cristais de gelo intracelulares e estresse oxidativo quando há reidratação da célula (KUSAKABE et al., 2001; KUSAKABE et al., 2008; MARTINS et al., 2007). Esses danos podem levar a morte da célula espermática, tornando incapazes de fertilizar, ou diminuindo a sua longevidade (BURGESS et

al., 2001).

Em um estudo com sêmen de cães, foi testada a adição de antioxidante às amostras frescas, refrigeradas e criopreservadas, com o objetivo de diminuir lesões nas estruturas do espermatozoide. No entanto, observou-se que a célula sofreu danos irreversíveis quando atingiu cerca de 5°C, período este que corresponde ao resfriamento rápido. Concluiu-se que mesmo com a adição de antioxidantes ao meio diluente, não foi possível evitar a ocorrência de tais injúrias, que se tornam irreparáveis a célula (CASTRO et al., 2016).

Apesar dos avanços na biotecnologia reprodutiva de cães, ainda há variações entre indivíduos nas taxas de descongelação de sêmen. Deste modo, deve-se aprofundar os estudos relacionados a bioquímica espermática, assim como o efeito da congelação sob a célula espermática (LUCIO et al., 2016b).

## **2.6. Proteínas do plasma seminal *versus* congelabilidade**

Pesquisas direcionadas à interação das proteínas durante a congelação de sêmen se iniciaram na espécie bovina, com a hipótese de que a criopreservação causa o extravasamento de proteínas e enzimas da membrana da célula (ROYCHOUDHURY et al., 1975; OLLERO et al., 1998). Dessa forma, estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de melhorar a capacidade de fertilização, refrigeração e criopreservação do sêmen com o auxílio e compreensão do envolvimento das proteínas do plasma seminal (PATEL et al., 2016).

Dentre essas macromoléculas, estão as proteínas ligadoras de heparina (HBP) do plasma seminal, envolvidas tanto na congelação do espermatozoide, quanto na fertilidade (MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA; KORDAN, 2011). Essas proteínas interagem com a superfície da célula (MILLER et al., 1990), favorecem a capacitação e reação acrossomal (MILLER et al., 1990).

Este fluido gera resultados supressivos no sêmen criopreservado (MARTINUS et al., 1991; KASAI et al., 2002). Para preservação *in vitro* do sêmen em cães é necessário a retirada do plasma seminal, para que este não atue de forma negativa na motilidade e viabilidade espermática (SIRIVAIIDYAPONG et al., 2001). Alguns pesquisadores têm investigado a influência negativa do fluido prostático sob o espermatozoide pré e pós-congelado (SIRIVAIIDYAPONG et al.,

2001).

Foi demonstrado que a adição da HBP, com 31 kDa, quando adicionada ao sêmen de touros antes da criopreservação apresentou resultados superiores de motilidade, viabilidade, teste hiposmótico quando comparado ao grupo não tratado, sugerindo que esta proteína garantiu proteção contra o choque térmico a célula criopreservada (PATEL et al., 2016).

O processo de congelação envolve efluxo de colesterol e ganhos e perdas de proteínas na membrana da célula, essas mudanças podem ser devido a adição do meio diluente e a refrigeração (WESTFALEWICZ et al., 2015). A saída de colesterol da membrana plasmática gera instabilidade ou reorganização na membrana (MANJUNATH e THERIEN, 2002).

Em búfalos, a adição de HBP em amostras criopreservadas foi estudada. O grupo de amostras acrescido de HBP apresentou parâmetros de motilidades superiores em comparação ao grupo controle (não tratado) na fase pré-congelamento. A hipótese é que essas proteínas podem se ligar aos fosfolipídios de colina na membrana plasmática do espermatozoide (KUMAR et al., 2008). No entanto, no pós-descongelamento foi observado que houve queda na motilidade dos grupos, isso pode ser decorrente a saída do colesterol da membrana plasmática, que pode ter exposto as células espermática ao estresse (KUMAR et al., 2008).

Em ovinos foram identificadas 362 proteínas no plasma seminal, destas 75 proteínas relacionadas ao grupo de animais que apresentaram melhor qualidade seminal pós-descongelado, e 48 proteínas relacionadas a pós-congelamento com baixos índices de viabilidade espermática (RICKARD et al., 2015). Das 75 proteínas do grupo que apresentou boa qualidade seminal no pós-congelado, 8 estavam envolvidas diretamente com a boa congelabilidade e relacionadas a resistência do choque térmico, sendo a maioria de origem espermática. Do grupo que obteve piores índices de qualidade seminal pós-congelado, 6 proteínas estavam relacionadas ao processo de criopreservação (RICKARD et al., 2015).

Além disso, já foi relacionado a concentração espermática com a quantificação de proteínas presentes no plasma seminal em ovinos, as quais foram submetidas a estresse térmico local, diminuindo, assim a concentração espermática (GATTI et al., 1999). Nesta mesma espécie, essas macromoléculas

são responsáveis por proteger a célula contra injúrias do choque térmico, decorrente da criopreservação (PEREZ et al., 2001).

Ademais, muitas pesquisas têm sido voltadas a compreender as funções proteicas presentes no plasma seminal com intuito de aplicar e melhorar o processo de congelamento espermática, ou estabelecer marcadores para a fertilidade e diagnóstico de doenças (MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA; KORDAN, 2011).

## **2.5. Proteínas do plasma seminal *versus* fertilidade**

Para compreender as etapas e mudanças envolvidas durante a fertilização é necessário estudar as interações entre células espermáticas e proteínas durante a ejaculação, assim como as funções de cada uma delas. As agregações proteicas são mecanismos importantes para este processo ocorra (MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA; KORDAN, 2011).

As proteínas são alguns componentes entre os diversos outros presentes no plasma seminal de mamíferos, porém essas, tem funções específicas relacionadas à fertilidade, pois a maioria se liga a membrana plasmática do espermatozoide (JONAKOVA; TICHA, 2003).

No plasma seminal de cães, foi visto que aproximadamente 50% é composto de HBP, e uma proteína com massa molecular de 61,5 kDa pode estar envolvida com reação de acrossomo (SOUZA et al., 2006). A heparina, na membrana plasmática do espermatozoide atua na perda de colesterol (CUNHA et al., 2016) e a capacitação espermática está ligada ao efluxo de lipídeos da membrana (THERIEN et al., 1998).

A adição das proteínas ligadoras de heparina (HBPs) com 31 kDa, ao sêmen fresco de touros, gerou maior capacitação nos espermatozoides e reação acrossomal, isso se deve a saída de colesterol da membrana plasmática da célula espermática (PATEL et al., 2016).

Em bovinos, durante a ejaculação, a membrana plasmática do espermatozoide sofre mudanças em sua composição, como a aderência das proteínas do plasma seminal de bovinos (BSPs) em sua superfície. Essas proteínas compõem uma família e são um tipo de proteínas HBP (KUMAR et al., 2008). Quando as BSPs se ligam a célula, elas também agem no sítio de ligação

da heparina (KUMAR et al., 2008).

Em bovinos, as BSPs compõem cerca de 70% do plasma seminal e são subdivididas em BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30kDa (MANJUNATH, 1984; DESNOYERS et al., 1994; THERIEN et al., 1998; NAUC; MANJUNATH, 2000). São secretadas pela vesícula seminal e pela ampola de algumas espécies (MANJUNATH e SAIRAM, 1987; MANJUNATH et al., 2009) e possuem massa molecular entre 12-30 kDa (MANJUNATH et al., 2007).

As BSP-A1 são as que estão em maior abundância no plasma seminal, estabilizam a membrana plasmática durante o trajeto no trato reprodutor da fêmea até o momento da capacitação e reação acrossomal (FAN et al., 2006; HUNG; SUAREZ, 2012).

Ademais, há estudos que sugerem que esse grupo de proteínas podem estar relacionadas à decapacitação dos espermatozoides no momento da ejaculação, pois as BSPs se ligariam aos fosfolipídios da membrana plasmática, impedindo a reação de acrossomo antes da fertilização (THERIEN et al., 1998). Há demonstrações de que as BSPs ligadas ao espermatozoide têm predisposição a se ligar a outras BSPs livre no plasma seminal por meio de interação hidrofóbica (BERGERON e MANJUNATH, 2004).

Além das BSPs, as GAGs também têm sido identificadas em diferentes espécies, tais como bovinos (CHANDONNET et al., 1990), equinos (FRAZER; BUCCI, 1996; REINERT et al., 1997), suínos (CALVETTE et al., 1996) e cães (SOUZA et al., 2006). São macromoléculas semelhantes a heparina e proteínas ligadoras de heparina. Podem ser utilizadas como marcadores para avaliar a fertilidade em bovinos (FERNANDES et al., 2006) e são encontradas também no trato reprodutor feminino (MILLER et al., 1990).

Em bovinos, as GAGs se ligam aos espermatozoides da cauda do epidídimo, o que resulta na maior sensibilidade das células espermáticas a ligação com a zona pelúcida implicando na fertilização, provavelmente essas macromoléculas estejam envolvidas na reação de acrossomo (MILLER et al., 1990).

Foi identificado no plasma seminal de cães íons de zinco, os quais tem forte afinidade a proteínas de várias massas moleculares, essas ligações são denominadas de *zinc-binding protein* (ZnBPs). O zinco é secretado pela próstata e glândulas vesiculares (BOURSNEILL et al., 1975; MOGIELNICKA-

BRZOWSKA et al., 2011) e também foi encontrado no plasma seminal de homens (ARVER, 1982).

Em cães 4 - 10% de proteínas totais do plasma seminal são a ZnBPs (MOGIELNICKA-BRZOWSKA et al., 2012), e está envolvida no processo de fertilização, por meio do reconhecimento entre espermatozoide e ovócito (AQUINO-CORTEZ et al., 2016). Além disso, Mogielnicka-Brzowska et al. (2014) encontraram correlação positiva entre a ZnBPs com integridade de membrana e motilidade.

A lactoferrina foi uma glicoproteína identificada no plasma seminal canino, com o uso de cromatografia de 3 fases, com massa molecular de 75,2 kDa (KIKUCHI et al., 2003). Este mesmo trabalho concluiu que esta proteína está ligada a função reprodutiva de cães e teve correlação com a alta quantidade de espermatozoide. Além disso, pode ser encontrada no fluido de outros órgãos e sua principal função esta relacionada à modulação do crescimento de bactérias e fungos (NOZAKI et al., 2003).

Outra proteína relacionada à fertilidade que se encontra na matriz extracelular (DENHARDT; GUO, 1993), secretada pela ampola e vesícula seminal (CANCEL et al., 1999), é a osteopontina. Esta já foi encontrada em bovinos, com massa molecular de 55kDa (KILLIAN et al., 1993).

Foi realizado *western blotting* com plasma seminal de cães e extrato proteico, observou-se a ocorrência de uma proteína com 15,6 kDa no anticorpo anti-osteopontina (SOUZA et al., 2009), a qual tem relação com melhora na motilidade pré e pós congelado com sêmen de cães (MARTINS et al., 2005). No entanto, a ligação no anticorpo anti-osteopontina foi incerta, não sendo possível a relação desta proteína com a fertilidade em cães (SOUZA et al., 2009).

A correlação da fertilidade com as proteínas do plasma seminal ou da membrana espermática ainda não foi completamente elucidada em cães. Diante deste entrave, resultados de estudos realizados em outras espécies são correlacionados aos cães, contudo, em vista da fisiologia distinta, essas conclusões podem ser inconsistentes. Desta maneira, estudos nas espécies são necessários e podem contribuir para elucidação da fisiologia reprodutiva, aquisição de meios diluentes adequados para criopreservação e elaboração de vacinas contraceptivas e aditivos seminais.

**REFERÊNCIAS\***

AITKEN, R. J.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 164, p. 542-555, 1991.

AQUINO-CORTEZ, A.; SILVA, L. D. M.; ARAÚJO, A. A.; MENEZES, A. S. B.; MOURA, A. A. N. Proteins of the canine seminal plasma. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 901-908, 2016.

ALHAIDER, A. K.; WATSON, P. F. Cryopreservation of dog semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. **Animal and Reproduction Science**, v. 110, p. 147–161, 2009.

AMANN, R.; HAMMERSTEDT, R. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.

ARVER, S. Zinc and zinc ligands in human seminal plasma. III. The principal low molecular weight zinc ligands in prostatic secretion and seminal plasma. **Acta Physiologica**, v. 116, p. 67-73, 1982.

BARBATO, G. E.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro spermegg binding assay that detects subfertile males. **Biology and Reproduction**, v. 58, p. 686-699, 1998.

BELL, F. W.; KLAUSNER, J. S.; HAYDEN, D. W.; LUND, E. M.; LIEBENSTEIN, B. B.; FEENEY, D. A. Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. **Journal of Veterinary and Internal Medicine**, v. 9, p. 149–153, 1995.

BENEL, L.; RNOT, X.; KORPROBST, M.; ADOLPHE, M.; MONOLOU, J. C.

---

\* Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2014

Mitochondrial uptake of rodhamine 123 by rabbit articular chondrocytes. **Cytometry**, v. 7, p. 281-285, 1986.

BERGERON, A.; CRÊTE, M. H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 708-717, 2004.

BOURSNELL, J. C.; NOBLE, E. A.; ANDREWS, M. G. Boar seminal zinc-precipitable protein and the haemagglutinin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.45, p. 415 - 420, 1975.

BRANAM, J. E.; KEEN, C. L.; LING, G. V.; FRANTI, C. E. Selected physical and chemical characteristics of prostatic fluid collected by ejaculation from healthy dogs and from dogs with bacterial prostatitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 825–829, 1984.

BURGESS, C. M.; BREDL, J. C. S.; PLUMMER, J. M.; ENGLAND, G. C. W. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 357–363, 2001.

BURROUGHS, C. A.; GRAHAM, J. K.; LENZ, R. W.; SEIDEL, J. R. Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm. **Theriogenology**, v. 79, p. 551–557, 2013.

CALVETTE, J.; DOSTALOVA, Z.; SANZ, L.; ADERMAN, K.; THOLE, H.; TOPFER-PETERSEN, E. Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. **FEBS Letters**, v. 379, p. 207-121, 1996.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology and Reproduction**, v. 60, p.454–460, 1999.

CARDILLI, D. J.; MOSTACHIO, G. Q. Anatomia do sistema genital masculino.

In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. (Org.). **Reprodução e obstetrícia em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2015. p. 31-36.

CASTRO, L. S.; HAMILTON, T. R. S.; MENDES, C. M.; NICHI, M.; BARNABE, V. H.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, p. 17, 2016.

CHANDONNET, L.; ROBERTS, K. D.; CHAPDELAINE, A.; MANJUNATH, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 313-318, 1990.

CHAPDELAINE, P.; DUBE, J. Y.; TREMBLAY, R. R. Identification of arginine esterase as the major androgen dependent secret by dog prostate and preliminary molecular characterization. **Journal of Andrology**, v. 5, p. 206-210, 1984.

CHENG, F. P.; FAZELI, A. R.; VOORHOUT, W. F.; MARKS, A.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B. Use of PNA (Peanut agglutinin) to assess the acrosomal status and the zona pellucida induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.17, p. 674–682, 1996.

CORCINI, C. D.; SILVA, B. E.; BRIZOLARA, R. M. R.; GHELLER, S. M. M.; VARELA JUNIOR, A. S.; BONGALHARDOI, D. C.; LUCIA JUNIOR, T. Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo da galinha. **Ciência Rural**, v. 42, p.142–146, 2012.

CRISCUOLO, T.; ROCHA, A. M.; SEMACO, T.; SERZEDELO, T.; ALEGRETTI, J. R.; SERAFINI, P.; MOTTA, E. L. A. Motile sperm binding to the egg yolk membrane is an easy and feasible function test for acrosome integrity. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v. 14, n. 4, p. 29-31, 2010.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635–641, 1989.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; KUSSANO, N. R.; MARTINS, C. F.; MOURAO, G. B.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa: resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 348-355, 2016.

DENHARDT, D. T.; GUO, X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **FASEB Journal**, v. 7, n. 15, p. 1475–1482, 1993.

DESNOYERS, L.; THERIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 425–435, 1994.

DUBÉ, J. Y.; LAZURE, C.; TREMBLAY, R. R. Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 9, p. 51-54, 1986.

ENGLAND, C.G.; ALLEN, W. E.; MIDDLETON, D. J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. **Research and Veterinary Science**, v. 49, p. 66–70, 1990.

FAN, J.; LEFEBVRE, J.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals. **Gene**, v. 375, p. 63–74, 2006.

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular of Reproductiion**, v. 32, p. 23–27, 1992.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal and Reproduction Science**, v. 42, p. 251–260, 1996.

FAZELI, A. R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; DE LOOS, F. A. M.; VAN DEN BROEK, J.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. **Veterinary Record**, v. 132, p. 14–16, 1993a.

FAZELI, A. R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; BRACHER, V.; PARLEVLIET, J.; COLENBRANDER, B. Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 15, p. 57–59, 1993b.

FAZELI, A. R.; HOLT, C.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; HOLT, W. V.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. **Theriogenology**, v. 44, p. 17–27, 1995.

FERNANDES, C. E.; SOUZA, F. F.; SOUZA-NETO, J. A.; RIBOLA, P. E. M. Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nelore bulls. **Ciência Rural**, v. 66, p. 1606-1609, 2006.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 46, p. 1389-1402, 1996.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J. Y.; TREMBLAY, R. R. Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 838, p. 270-276, 1985.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHAL, C. E. Fluometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GATTI, J. L.; DRUART, X.; GUERIN, Y.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of

this ACE Analysis by two-dimensional gel electrophoresis of ram epididymal secreted proteins. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 937–945, 1999.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; CORRADA, Y. Serum and seminal markers in the diagnosis of the genital tract of the dog: a mini-review. **Theriogenology**, v. 57, p. 1285-1291, 2002.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239–247, 2001.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55–64, 1990.

GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation cell death axis in organismal aging. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1109-1112, 2011.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73–88, 1990.

HARRISON, R. A. P.; ASHWORTH, P. J. C.; MILLER, N. G. A. Assessment of sperm function under fertilizing conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 25–30, 1996.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 51, p. 99–108, 1997.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Manipulation of canine fertility using in vitro culture techniques. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 111–125, 2001.

HOLT, W. V.; VAN LOOK, K. J. W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Society for Reproduction and Fertility**, p. 1741–7899, 2004.

HARROP, A. E. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. **British Veterinary Journal**, v. 110, p. 24–25, 1954.

HUNG, P. H.; SUAREZ, S. S. Alterations to the bull sperm surface proteins that bind sperm to oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 88, 2012.

ISAACS, W.; SHARPER, J.H. Immunological localization and quantification of the androgen dependent secretory protease of canine prostate. **Endocrinology**, v. 117, p. 1512-1520, 1985.

JODAR, M.; VENTURA, A. S.; OLIVA, R. Semen proteomics and male infertility. **Journal of Proteomics**, p. S1874-3919, 2016.

JOHNSTON, S. D.; ROOT KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. N. S. Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: \_\_\_\_\_. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 41-65.

JONAKOVA, V.; TICHA, M. Boar seminal plasma proteins and their binding properties. A review. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 69, n. 3, p. 461-475, 2003.

KASAI, T.; OGAWA, K.; MIZUNO, K.; NAGAI, S.; UCHIDA, Y.; OHTA, S.; FUJIE, M.; SUZUKI, K.; HIRATA, S.; HOSHI, K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, n. 2, p. 97–103, 2002.

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

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KLAUNSNER, J.S.; JOHNSTON, S.D.; BELL, F.W. Canine prostatic disorders. In: Bonagura JD, Kirk RW, editors. Current veterinary therapy XII. Philadelphia: Saunder, 1995, p. 1103-10.

KORDAN, W.; FRASER, L.; WYSOCKI, P.; STRZEŻEK, R.; LECEWICZ, M.; MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; DZIEKOŃSKA, A.; SOLIWODA, D.; KOZIOROWSKA-GILUN, M. Semen quality assessments and their significance in reproductive technology. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, p. 823–833, 2013.

KOROCHKINA, E.; JOHANNISSON, A.; GOODLA, L.; MORRELL, J. M.; AXNER, E. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozenthawed canine epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 82, p. 1206–1211, 2014.

KUSTRITZ, M. V. The value of canine semen evaluation for practitioners. **Theriogenology**, v. 68, p. 329–337, 2007.

KUMAR, A.; SINGH, L. P.; HARSHAN, H. M.; MAJUMDAR, A. C. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). **Animal Reproduction Science**, v.104, p. 220–226, 2008.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, p. 1279–1289, 1993.

KUSAKABE, H.; SZCZYGIEL, M. A.; WHITTINGHAM, D. G.; YANAGIMACHI, R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. **Proceedings of the National Academic of Sciences USA**, v. 98, p. 13501–13506, 2001.

KUSAKABE, H.; YANAGIMACHI, R.; KAMIGUCHI, Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. **Human and Reproduction**, v. 23, p. 233–372, 2008.

LARSON, B. L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma. 1. Preliminary and electrophoretic studies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 206, p. 741-749, 1954.

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 327–336, 2000.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, p. 759–778, 2011.

LINDE FORSBERG, C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE FORSBERG, C. (Ed.). **Recent advances in small animal reproduction**. 2014. Disponível em: <<http://www.ivis.org/advances/Concannon/linde3/chapter.asp?LA=1>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

LUCIO, C. F.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C. G.; ANGRIMANI, D. S. R.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. **Theriogenology**, v. 85, p. 1568–1575, 2016a.

LUCIO, C. F.; BRITO, M. M.; ANGRIMANI, D. S. R.; BELAZ, K. R. A.; MORAIS, D.; ZAMPIERI, D.; LOSANO, J. D. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; NICHI, M.; EBERLIN, M. N.; VANNUCCHI, C. I. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, suppl. 3, p. 1–6, 2016b.

MANN, T. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 23, p. 133–137, 1978.

MANJUNATH, P. Gonadotropin release and stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: SAIRAM, M. R.; ATKINSON, L. E. (Ed.). **Gonadal proteins and peptides and their biological significance**. Singapore: World Scientific Publishing Co, 1984. p. 49-61.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSPA3) from bovine seminal plasma. **Biochemistry Journal**, v. 241, p. 685–692, 1987.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 27-37, 1994.

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

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 217-228, 2007.

MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P. S.; FAN, J.; WRIGHT, M. W. New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 394–397, 2009.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. 2005. p. 122. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARTINS, C. F.; BAO, S. N.; DODEA, M. N.; CORREA, G. A.; RUMPF, R. Effects of freezedrying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine 384 sperm. **Theriogenology**, v. 67, p. 1307–1317, 2007.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, v. 66, p. 2047–2055, 2006.

MASON, S. J.; ROUS, N. R. Comparison of endoscopic-assisted transcervical and laparotomy insemination with frozenthawed dog semen: a retrospective clinical study. **Theriogenology**, v. 82, p. 844–850, 2014.

MARTINUS, R. D.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryo-preservation of bovine spermatozoa. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 34, p. 281–285, 1991.

McENTEE, M.; ISAACS, W.; SMITH, C. Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. **Prostate**, v. 11, p. 163-170, 1987.

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

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; KORDAN, W. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, p. 489–499, 2011.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; FRASER, L.; CZARZASTA, J.; KORDAN, W. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 15, p. 493–498, 2012.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; DZIEKONSKA, A.; STRZEZEK, R.;

ZALEZCKI, M.; MAJEWSKA, A.; TOLSCIK, K.; KORDAN, W. Effect of zinc-binding proteins of seminal plasma on motility and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, p. 163–168, 2014.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; STRZEZEK, R.; WASILEWSKA, K.; KORDAN, W. Prostatosomes of canine seminal plasma – zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 484–491, 2015a.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; KOWALSKA, N.; FRASER, L.; KORDAN, W. Proteomic Characterization of Zinc-Binding Proteins of Canine Seminal Plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 1017–1021, 2015b.

MOLLO, A.; BOSISIO, P.; AVEZZA, F.; LUVONI, C. G. Concentrazione della fosfatasi alcaline nel plasma seminale del cani. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, p. 171–172, 1997.

MOREAU, R.; MANJUNATH P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1438, p. 175-184, 1999.

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

OLSON, P. N.; BEHRENDT, M. D.; AMANN, R. P.; WEISS, D. E.; BOWEN, R. A., NETT, T. M. Concentrations of carnitine in the seminal fluid of normospermic, vasectomized and castrated dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 1211–1215, 1987.

OURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105–151,

1990.

PATEL, M. K.; CHEEMA, R. S.; BANSAL, A. K.; GANDOTRA, V. K. A 31-kDa seminal plasma heparin-binding protein reduces cold shock stress during cryopreservation of cross-bred cattle bull semen. **Theriogenology**, v. 86, p. 1599–1606, 2016.

PELLICCIONE, F.; MICILLO, A.; CORDESCI, G.; D'ANGELI, A.; NECOZIONE, S.; GANDINI, L.; LENZI, A.; FRANCAVILLA, F.; FRANCAVILLA, S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. **Fertility and Sterility**, v. 95, p. 641–646, 2011.

PEÑA MARTÍNEZ, A. I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83 p, 209–224, 2004.

PEÑA, F. J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M. Semen technologies in dog breeding: an update. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p.21–29, 2006.

PEREZ-PE, R.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 425–434, 2001.

PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 109–124, 2012.

PRAPAIWAN, N.; THARASANIT, T.; PUNJACHAIPORNPOL, S.; YAMTANG, D.; ROONGSITTHICHAI, A.; MOONARMART, W.; KAEOKET, K.; MANEE-IN, S. Low-density lipoprotein improves motility and plasma membrane integrity of cryopreserved canine epididymal spermatozoa. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 5, p. 646-651, 2016.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, p. 373–383, 2013.

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

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potencial. **Biochemistry**, v.30, p.4480-4486, 1991.

RICKARD, J. P.; LEAHYA, T.; SOLEILHAVOUPB, C.; TSIKISB, G.; LABASB, V.; HARICHAUXB, G.; LYNCHA, G. W.; DRUARTB, X.; DE GRAAFA, S. P. The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. **Journal of Proteomics**, v. 126, n. 3, p. 303–311, 2015.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; DE KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. **Theriogenology**, v. 64, p. 706–719, 2005.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; NIZANSKI, W. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 204–207, 2012.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, p. 11–22, 2011.

RONQUIST, G.; HEDSTROM, M. Restoration of detergent-inactivated adenosine triphosphatase activity of human prostatic fluid with concanavalin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 483, p. 483–486, 1977.

SANTOS, M. C. R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação de espermatozoides caprinos**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 1848–1858, 2006.

SATORRE, M. M.; BREININGER, E.; BECONI, M. T.; BEORLEGUI, N. B. Alpha-tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. **Theriogenology**, 68, p. 958–965, 2007.

SION, B.; JANNY, L.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 108–1014, 2004.

SIRIVAIIDYAPONG, S.; URSEM, P.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen–thawed dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 383–386, 2001.

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

SOUZA, F. F. **Caracterização eletroforética do perfil proteico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 2003. 98 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2003.

SOUZA, F. F.; MARTINS, M. I.; FERNANDES, S. C. E.; RIBOLLA, P. E.; LOPES, M. D. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. **Theriogenology**, v. 66, p. 1606–1609, 2006.

SOUZA, F. F.; MARTINS, M. I. M.; FERNANDES, C. E. S.; RIBOLLA, P. E. M.; LOPES, M. D. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. **Theriogenology**, v. 66, p. 1606–1609, 2006.

STANDERHOLEN, F. B.; MYROMSLIEN, F. D.; KOMMISRUUD, E.; ROPSTAD, E.; WATERHOUSE, K. E. Comparison of electronic volume and forward scatter principles of cell selection using Flow Cytometry for the evaluation of acrosome and plasma membrane integrity of Bull spermatozoa. **Cytometry Part A**, v. 85, p. 719-728, 2014.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; NOURMOHAMMADI, I.; MAHJUB, H.; VAISIRAYGANI, A.; SALIMI, S.; HOSSEINIPANAH, S. M. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 45–50, 2007.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUGNER, J. A.; BERG, K. A.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, v. 66, p. 1645–1650, 2006.

WACLAWEK, M.; FOISNER, R.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W. I. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. **Biology and Reproduction**, v. 59, p. 1230-1239, 1998.

WANG, S.; WANG, W.; XU, Y.; TANG, M.; FANG, J.; SUN, H.; SUN, Y.; GU, M.; LIU, Z.; ZHANG, Z.; LIN, F.; WU, T.; SONG, N.; WANG, Z.; ZHANG, W.; YIN, C. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. **Proteomics**, v. 14, p. 298–310, 2014.

WESTFALEWICZ, B.; DIETRICH, M. A.; CIERESZKO, A. Impact of cryopreservation on bul semen proteome. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 11, p. 5240-5253, 2015.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of batches of bovine oocytes on the outcome of an intact zona pellucida binding assay and in vitro fertilization. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 213–220, 1998.

## **CAPÍTULO 2**

## ARTIGO I

**Novo protocolo com sonda fluorescente para avaliação de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial em cães****A new multicolor protocol to evaluate plasma and acrosome membrane integrity, and mitochondrial potential of dogs**

Artigo submetido a revista Ciência Animal Brasileira. Normas disponíveis em <https://www.revistas.ufg.br/vet/about/submissions#authorGuidelines>.

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da associação de Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI), isotiocianato de fluoresceína conjugado aglutinina *Pisum sativum* (PSA) e *MitoStatus Red* (BD Pharmingen™, EUA) para avaliação de membrana plasmática, de acrossomo e potencial de mitocôndria por citometria de fluxo. Foram utilizados 10 ejaculados da espécie canina. Após avaliação o sêmen foi dividido em duas alíquotas, sêmen fresco e *flash-frozen*. O *flash-frozen* foi realizado em nitrogênio líquido, em 6 ciclos contínuos de congelamento e descongelamento em banho maria a 46°C. As amostras foram preparadas utilizando uma proporção de sêmen fresco: flash-frozen, em 3 tratamentos, ~ 100%: 0% (T0 - fresco), ~50%: 50% (T50) e 0%: 100 % (T100 – *flash frozen*). Em seguida, adicionou-se a cada amostra uma solução contendo 5 µM de PI, 7 µM de H342, 1 ng de FITC-PSA e 20 nM de *MitoStatus Red*. Pelo menos 10.000 células por amostra foram analisadas por citômetro de fluxo. A regressão linear indicou um alto grau de correlação entre PI negativo e integridade da membrana plasmática ( $R^2 = 0,957$ ), FITC-PSA negativo e acrosoma integridade ( $R^2 = 0,998$ ) e *MitoStatus Red* positivo e células com alto potencial mitocondrial ( $R^2 = 0,931$ ). Foram testadas 4 concentrações (20 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM) da sonda *MitoStatus Red*, e concluiu-se não interferência na avaliação do potencial mitocondrial nas concentrações de 20 e 50 nM, optando-se, assim, por utilizar 20 nM para análise em espermatozoides de cães. Dessa forma, este protocolo foi consistente, aplicável e apresentou valores reais de integridade da membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial quando analisados por citômetro de fluxo, validando uma nova técnica, com a determinação da concentração ideal da sonda para este tipo de análise.

**Palavras-chave:** Acrossomo; Canino; Espermatozoide; Mitocôndria

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the efficiency of the combination of Hoechst 33342 (H342), propidium iodide (PI), fluorescein isothiocyanate conjugated agglutinin Pisum sativum (PSA) and MitoStatus Red (BD Pharmingen, USA) for plasma membrane Acrosome and mitochondrial potential by flow cytometry. Ten ejaculates of the canine species were used. After evaluation the semen was divided into two aliquots, fresh and flash-frozen semen. The flash-frozen was carried out in liquid nitrogen in 6 continuous cycles of freezing and thawing in a water bath at 46°C. Samples were prepared using a fresh: flash-frozen semen ratio, in 3 treatments, ~100%: 0% (T0-fresh), ~ 50%: 50% (T50) and 0%: 100% (T100-flash Frozen). Then, a solution containing 5 µM IP, 7 µM of H342, 1 ng FITC-PSA and 20 nM MitoStatus Red was added to each sample. At least 10,000 cells per sample were analyzed by flow cytometry. The linear regression indicated a high degree of correlation between negative PI and plasma membrane integrity ( $R^2 = 0.957$ ), FITC-PSA negative and acrosome integrity ( $R^2 = 0.998$ ) and MitoStatus Red positive and cells with high mitochondrial potential ( $R^2 = 0.931$ ). Four concentrations (20 nM, 50 nM, 100 nM and 200 nM) of the MitoStatus Red probe were tested, and no interference was assessed in mitochondrial potential assessment at concentrations of 20 and 50 nM, thus opting to use 20 nM for analysis in dogs spermatozoa. Thus, this protocol was consistent, applicable and presented real values of plasma membrane integrity, acrosomal and mitochondrial function when analyzed by flow cytometer, validating a new technique, with determination of the ideal concentration of the probe for this type of analysis

**Keywords:** Acrosome, Canine, Spermatozoa, Plasmatic membrane, Mitochondrial

## 63 1. Introdução

64 Estudos relacionados a fertilidade e capacitação espermática em cães vem sendo  
65 desenvolvidos ao longo dos anos, pois são modelos experimentais para canídeos  
66 selvagens em extinção [1,2].

67 Métodos de avaliação *in vitro* da célula espermática permitem predizer a fertilidade.  
68 Vários métodos foram descritos, sendo os principais a cinética espermática, avaliada por  
69 análise computadorizada, integridade da membrana plasmática e acrossomal e potencial  
70 mitocondrial por citometria de fluxo, as quais já foram validadas individualmente nos  
71 últimos anos na espécie canina [1,3].

72 A avaliação detalhada das células espermáticas de uma amostra permite analisar a  
73 qualidade do sêmen de cão e características do espermatozoide [4]. Além disso, o uso de  
74 sondas fluorescentes concomitante com a citometria de fluxo permite analisar uma grande  
75 quantidade de células em um curto intervalo de tempo [3], com alta taxa de repetibilidade  
76 e sensibilidade [5].

77 A membrana plasmática íntegra do espermatozoide tem o papel de determinar a  
78 arquitetura e metabolismo da célula, e mudanças nesta estrutura são necessárias para que  
79 ocorra a capacitação e fertilização [6].

80 A membrana acrossomal está envolvida no processo de fertilização, a qual contém  
81 inúmeras enzimas hidrolíticas. Esta pode sofrer danos durante a refrigeração e  
82 criopreservação [6].

83 A mitocôndria da célula espermática está envolvido em modificações lipídicas,  
84 balanço de cálcio, assim como na morte celular [7]. O uso de sondas fluorescentes é capaz  
85 de monitorar mudanças na produção de ATP pela fosforilação oxidativa [7].

86 A sonda fluorescente de escolha para este estudo foi o *MitoStatus Red*, o qual tem  
87 características de um cátion lipofílico, e é avaliado em um único canal de fluorescência.  
88 É utilizado para avaliação de potencial mitocondrial, a partir da despolarização da  
89 mitocôndria [8]. A fim de reduzir o tempo e consumo de amostra, esse estudo objetivou  
90 validar uma nova técnica associando a avaliação da integridade de membrana plasmática  
91 e de acrossomo, e potencial mitocondrial das células espermáticas de cães. Ademais,  
92 determinou-se a concentração ideal da sonda *MitoStatus Red* para avaliação do potencial  
93 mitocondrial.

94

## 95 2. Material e Métodos

96

## 97 2.1. Reagentes

98 Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e adquiridos das empresas  
99 GE Healthcare (Uppsala, Suécia), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e BD Pharmingen™  
100 (São Paulo, Brasil), quando não, foram citados.

101

## 102 2.2. Aspectos éticos

103 Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
104 (COBEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pela  
105 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) Institucional, sob o protocolo nº 97/2015.

106

## 107 2.3. Animais e colheita do sêmen

108 Foram utilizados 10 ejaculados, de cães saudáveis, com idade entre 2 a 5 anos. Foi  
109 utilizado o terceiro ejaculado, após 2 colheitas com intervalo de 3 dias entre cada uma.  
110 Os animais foram selecionados de acordo com as características seminais, segundo a  
111 análise do sêmen e o temperamento adequado ao manejo. Dez ejaculados foram colhidos  
112 por manipulação digital do pênis.

113 Apenas cães com motilidade total acima de 75% e concentração espermática de  
114  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL foram considerados para o estudo.

115 Para de avaliação de motilidade espermática foi realizada análise computadorizada  
116 (Hamilthon-Thorne Computer-Aided Semen Analyzer, CASA System, versão 10 Ivos,  
117 HTR-IVOS 10 Analyzer, Hamilthon Thorne Research, Beverly, MA, US).

118

## 119 2.4. Preparação das amostras

120 Duas alíquotas de 500 µL de cada ejaculado foram utilizadas para citometria de fluxo,  
121 sendo uma considerada como controle positivo (~100% vivos) e a outra como negativo  
122 (0%).

123 A amostra controle negativo foi submetida a 6 ciclos de congelção (*flash-frozen*)  
124 em nitrogênio líquido e descongelção em banho Maria a 46° C consecutivamente, para  
125 indução de lesão nas membranas plasmática e acrossomal, assim como ausência de  
126 atividade mitocondrial. Ao final desses ciclos os controles fresco e *flash frozen* foram  
127 utilizados para a produção de uma terceira amostra na proporção de 50% de cada controle.

128 Desta forma, foram obtidos 3 tratamentos, sendo ~100%: 0% (T100), 50%: 50%  
129 (T50) e 0%: 100% (T0) de fresco: flash frozen.

130 Após a preparação, uma alíquota de cada tratamento foi diluída em TALP-PVA

(modificado de Parrish et al., 1988; 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil - PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Desta mistura foram retirados 200 µL de cada tratamento, incubados com as sondas fluorescentes.

As sondas utilizadas foram 5 µL de H342 (7,0 µM em água destilada), 2,5 µL de IP (1,5 µM em TALP-PVA), 0,2 µL de FITC-PSA (1,0 ng em solução de 0,01% de azida de sódio) e a sonda *MitoStatus Red* (DMSO) nas concentrações na solução final de 20 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM. Os volumes do DMSO, veículo utilizado para diluição da sonda, utilizados nas concentrações foram, respectivamente, 2 µL, 5µL, 10 µL e 20 µL. A seguir, as amostras de cada tratamento, acrescidas das sondas foram mantidas em banho Maria a 37°C por 15 minutos e analisadas em citômetro de fluxo.

143

#### 144 2.5. Citometria de fluxo

As análises foram realizadas no LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), equipado com 3 lasers de excitação (violeta: 405 nm 50 mw; azul: 488 nm 50 mw; vermelho: 640 nm 40 mw).

As configurações dos filtros para a mensuração da emissão de fluorescência foram 530/30 nm (FITC-para PSA); 694/50 nm (PerCP-Cy-5.5 para IP); 660/20 nm (APC-para *MitoStatus Red*); e 450/50 nm (Pacific Blue para H342) e a compensação da autofluorescência e dos controles de uma cor foram realizadas para evitar a sobreposição de ondas.

Os gráficos gerados a partir dos resultados da citometria de fluxo, utilizados para todas as análises, foram *dot-plots* bi-exponenciais garantindo que todos os dados fossem visíveis, corretamente compensados e foram utilizadas 10.000 células/amostra.

156

#### 157 2.6. Análise estatística

Todas as variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a média e o desvio padrão foram usadas como medidas centrais e de dispersão. As diferenças estatísticas entre os tratamentos (T0, T50 e T100) para cada grupo (diferentes concentrações de *MitoStatus Red*) foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey quando paramétricos e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn quando não-paramétrico, atribuindo um nível de significância de 5%.

164 A seguir, foi realizada análise de regressão linear para os diferentes tratamentos (T0,  
165 T50, e T100) para cada sonda, nos grupos que apresentaram diferenças entre os  
166 tratamentos.

167 Para determinar a melhor concentração da sonda *MitoStatus Red* foram avaliadas as  
168 medianas de intensidade de fluorescência para cada tratamento dentro de cada grupo  
169 (Figura 1).

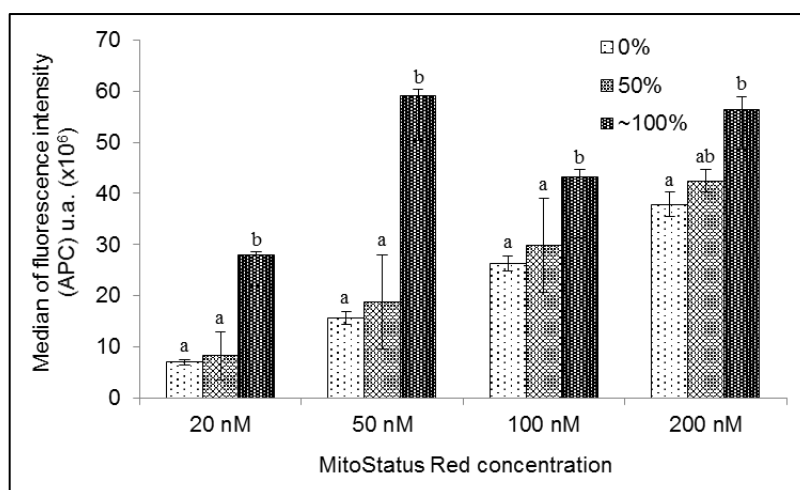
170 O programa *GraphPadInstat 6.0 - 2007* (San Diego, CA, USA) foi utilizado para a  
171 análise.

172

### 173 3. Resultados

174 As concentrações de 20 nM e 50 nM da sonda *MitoStatus Red* não interferiram na  
175 integridade da membrana plasmática, enquanto as concentrações de 100 nM e 200 nM  
176 resultaram em uma queda da integridade, podendo interferir nos resultados (Figura 2).

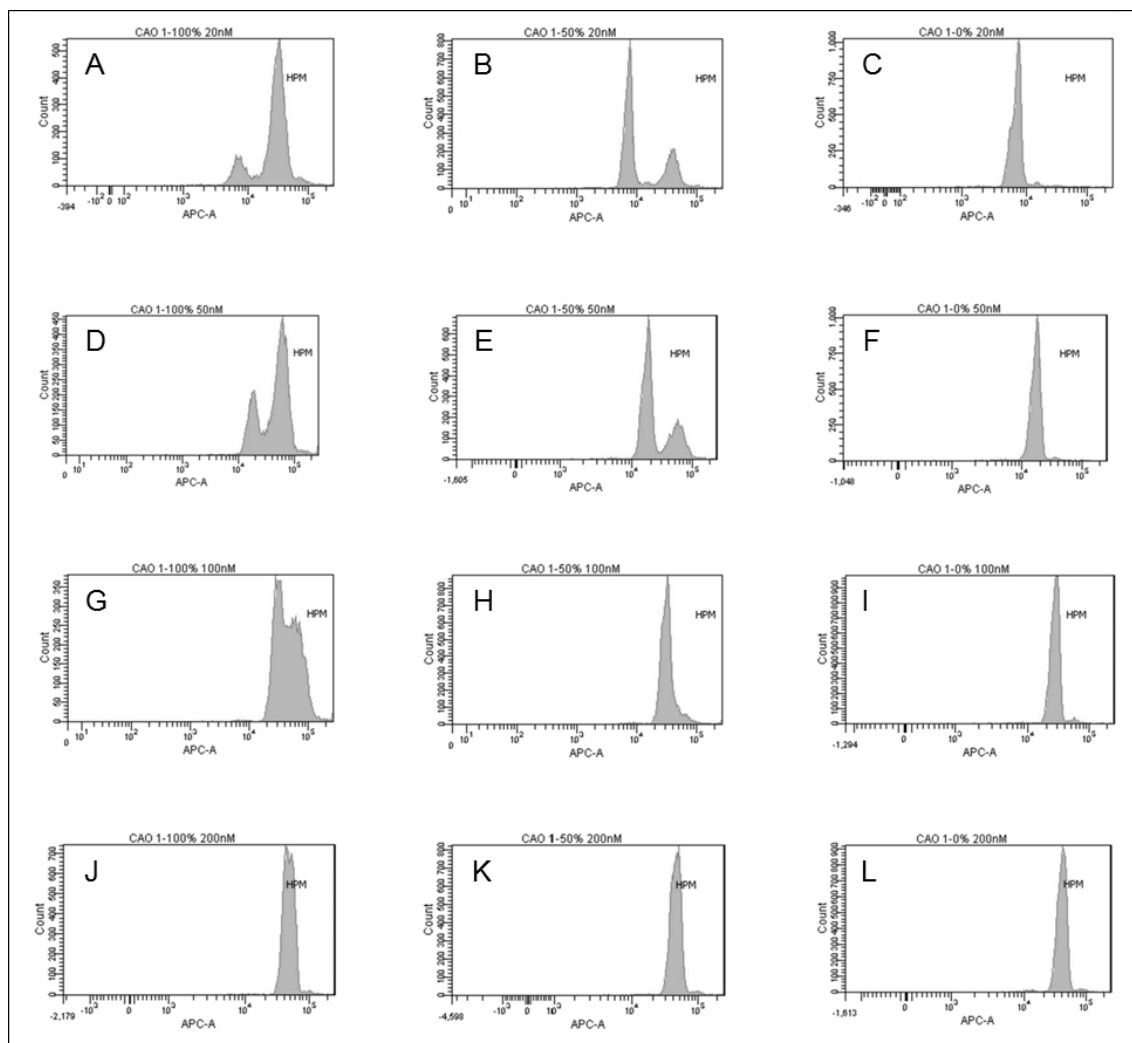
177 A regressão linear entre a concentração de 20 nM e integridade de acrossoma, e entre  
178 o potencial mitocondrial e integridade de membrana plasmática indicou um alto  
179 coeficiente de determinação. A figura 3A corresponde a lesão de acrossomo (sonda FITC-  
180 PSA) a figura 3B corresponde a avaliação de potencial mitocondrial (*MitoStatus Red*) e  
181 a figura 3C a lesão de membrana plasmática (sonda IP).



182

183 **Fig. 1.** Valores das medianas da intensidade de fluorescência para as diferentes concentrações  
184 testadas da sonda fluorescente *MitoStatus Red*, nos tratamentos T0, T50 e T100.

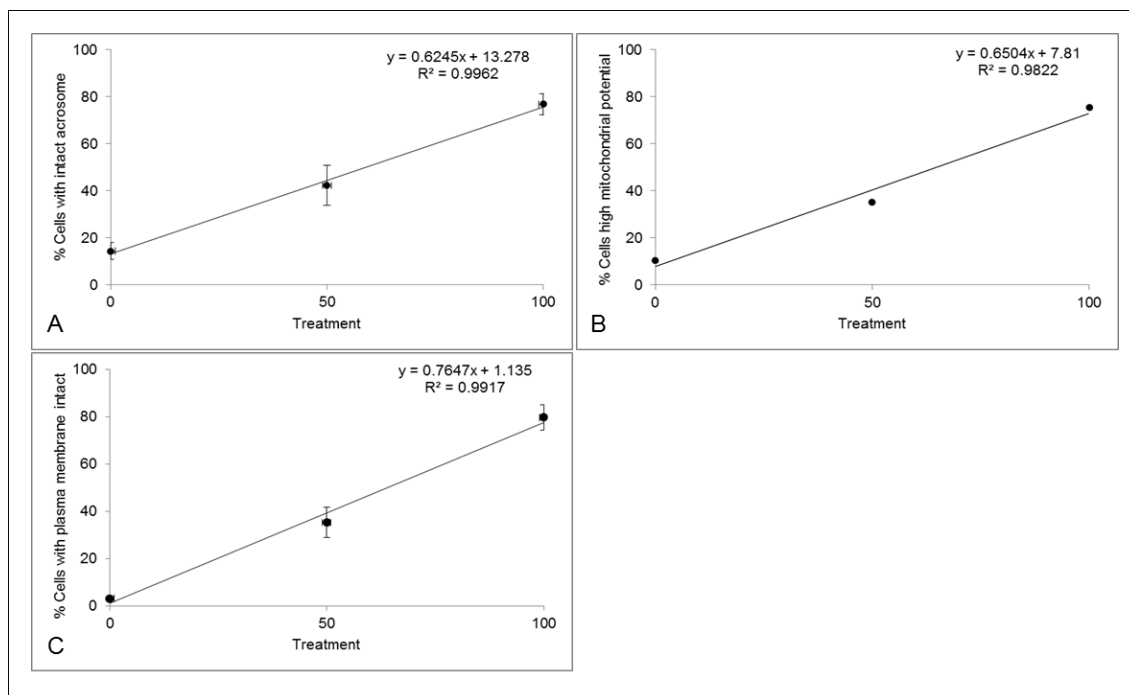
185



186

187 **Fig. 2.** Histograma da intensidade de fluorescência da sonda *MitoStatus Red*. Em todos os  
 188 gráficos, o primeiro pico representa a baixa intensidade e segundo a alta intensidade de  
 189 fluorescência das amostras seminais nas concentrações de 20 nM (A, B e C), 50 nM (D, E e F),  
 190 100 nM (G, H e I) e 200 nM (J, K e L), nos tratamentos de ~100% vivos (A, D, G e J), 50% vivos  
 191 (B, E, H e K), 0% vivo (C, F, I e L) para a determinação da melhor concentração de *MitoStatus*  
 192 *Red*.

193



**Fig. 3.** Regressão linear da sonda fluorescente FITC – PSA, porcentagem de células com acrossomo íntegro (A), *MitoStatus Red*, sobre potencial mitocondrial (B) e sonda Iodeto de propídio, com porcentagem de membranas plasmáticas intactas (C) nos tratamentos T0, T50 e T100.

#### 4. Discussão

A importância de se estabelecer novos protocolos de avaliação espermática em cães possibilita inferir, de forma pontual sobre as injúrias ocasionadas pela criopreservação ou a respeito da baixa viabilidade de uma amostra de sêmen fresco oriunda de um macho com alterações na fertilidade, visando um diagnóstico.

Danos que ocorrem na mitocôndria podem gerar prejuízo a célula espermática [9]. A mitocôndria aumenta o volume no momento da capacitação, esse fato sugere a importância desta organela no momento da fertilização [10].

O JC-1 é uma sonda para avaliação de potencial mitocondrial a qual pode marcar 3 populações (baixo, médio e alto potencial mitocôndria), sendo assim seu comprimento de onda é identificado em dois filtros (FITC – 525/50 nm e PE 585/42 nm), o que dificulta sua associação com outras sondas, tais como FITC-PSA para avaliação de integridade de acrossomo, pois o citometro de fluxo identifica a lesão da célula a partir da emissão da coloração das sondas fluorescentes. No entanto, em microscopia de fluorescência o operador pode identificar a localização da lesão no espermatozoide, em cabeça e/ou cauda, porém este método não permite a contagem de grande número de células em um

216 curto período de tempo.

217 Outra sonda utilizada é a *Mito Tracker green FM*, que emite fluorescência quando  
218 ligado aos lipídeos mitocondriais [15]. Porém a utilização dos filtros para interpretação  
219 dos potenciais mitocondriais são os mesmos aplicados ao JC-1.

220 Além disso, na interpretação dos resultados, utilizando a sonda *Mito Tracker green*  
221 e avaliação na microscopia, pode haver dificuldade na localização da fluorescência nas  
222 porções do espermatozoide, em vista de ligações não-específica, como na cabeça e na  
223 cauda do espermatozoide, podendo gerar uma interpretação errônea [16, 17].

224 Várias associações de sondas, incluindo o *Mito Tracker green*, o FITC-PSA, IP e o  
225 Hoescht 3342, tem sido descritas a fim de otimizar a técnica, ou seja, avaliar diferentes  
226 características de viabilidade espermática (potencial mitocondrial, integridade de  
227 acrossomo e integridade de membrana plasmática) em um único teste. Neste sentido, o  
228 presente estudo descreveu a associação destas mesmas sondas, com exceção do potencial  
229 mitocondrial, que foi avaliado pela *MitoStatus Red*.

230 As escolhas das concentrações foram obtidas a partir da indicação do fabricante, o  
231 qual indica realização da técnica entre 20 nM e 200 nM, além disso foram testadas  
232 concentrações intermediárias da sonda como 50 nM e 100 nM.

233 Neste sentido, intencionou-se determinar a concentração ideal da sonda para que não  
234 interferisse na avaliação da viabilidade das células. Este estudo demonstrou que a  
235 concentração de 20 nM é viável, visto é possível analisar um maior número de amostras  
236 com menor quantidade de sonda. Além disso, os resultados usando 20 nM ou 50 nM  
237 foram similares em termos de manutenção da viabilidade espermática, justificando, assim  
238 o uso em menor concentração, pois torna a técnica mais aproveitável.

239 A diferenciação da intensidade de fluorescência entre T0 e T100 entre as  
240 concentrações de 100 nM e 200 nM não foram distintas. Além disso, as duas  
241 concentrações podem ter acarretado em lesão da membrana plasmática e do acrossomo  
242 das células íntegras devido a quantidade maior de DMSO usado para a diluição da sonda.

243 O DMSO possui capacidade de penetração na célula espermática, podendo causar  
244 injúrias ou morte celular [18]. Em bovinos, o DMSO induz a diminuição da absorção de  
245 oxigênio pela célula espermática [19]. Em cães, pode estar relacionado, de forma  
246 negativa, com o metabolismo celular, podendo levar também, a diminuição da motilidade  
247 [20]. Ademais, as células espermáticas do cão são mais sensíveis ao choque osmótico  
248 [20], o que pode ter ocorrido nas concentrações de 200 nM e 100 nM.

249 Os resultados das comparações nos diferentes tratamentos (concentrações da sonda

250 *MitoStatus Red*) demonstraram que a avaliação segundo a concentração indicada pelo  
 251 fabricante, nesta espécie, deve ser adaptada, já que as injúrias promovidas nas mais altas  
 252 concentrações da sonda (100 nM e 200 nM) foram prejudiciais a estrutura da membrana  
 253 (integridade da membrana plasmática e do acrossomo), o que poderia ocasionar um  
 254 resultado incorreto.

255 Os resultados deste estudo indicam que foi possível a combinação da sonda  
 256 *MitoStatus Red* com outras sondas fluorescentes, além de poder utilizá-la em menor  
 257 concentração, tornando a técnica menos dispendiosa. Além disso, foi possível realizar  
 258 análises simultâneas das células com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras e alto  
 259 potencial mitocondrial em cães.

260

## 261 **Referências**

- 262 [1] Hewitt DA, England GCW. Manipulation of canine fertility using in vitro culture  
 263 techniques. J Reprod Fertil Suppl 2001;57:111–25.
- 264 [2] Nizański W, Partyka A, Rijsselaere T. Use of fluorescent stainings and flow cytometry  
 265 for canine semen assessment. Reprod Domest Anim 2012;6:215-21.
- 266 [3] Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A. New techniques  
 267 for the assessment of canine semen quality: a review. Theriogenology 2005;64:706–19.
- 268 [4] Daub L, Geyer A, Reese S, Braun J, Otdorff C. Sperm membrane integrity in fresh  
 269 and frozen-thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with the  
 270 NucleoCounter SP-100. Theriogenology 2016;86:651–6.
- 271 [5] Petrunkina A, Waberski D, Gunzel-Apel A, Topfer-Petersen E. Determinants of  
 272 sperm quality and fertility in domestic species. Reproduction 2007;134:3–17.
- 273 [6] Keel BK, Webster BW. Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of  
 274 infertility. CRC Press, Boston MA 1990;80-96.
- 275 [7] Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane  
 276 potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. Biotechniques 2011;50:  
 277 98–115.
- 278 [8] BD Pharmigen MitoStatus Reagentes.
- 279 [9] Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. Annu Rev  
 280 Biochem, 2012;76:723–49.
- 281 [10] Vorup-Jensen T, Hjort T, Abraham-Peskir JV, Guttman P, Jensenius JC, Uggerhoj  
 282 E, Medenwaldt R. X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of  
 283 mitochondrial morphology after capacitation. Human Reproduction 1999;14:880–4.

- 284 [11] Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, D'Angeli A, Necozone S, Gandini L, Lenzi  
285 A, Francavilla F & Francavilla S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is  
286 strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*  
287 2011;95:641–6.
- 288 [12] Ford WC. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum  
289 go round? *Human Reproduction Update* 2006;12:269–74.
- 290 [13] De Biasi S, Gibellini L, Cossarizza A. Uncompensated Polychromatic Analysis  
291 UNIT 7.32 of Mitochondrial Membrane Potential Using JC-1 and Multilaser Excitation.  
292 *Curr Protoc Cytom.* 2015;72:732.1-1.
- 293 [14] Cossarizza A, Baccarani-Conti M, Kalashnikova G, Franceschi, C. 1993. A new  
294 method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the  
295 J-aggregate forming lipophilic cation 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazol-  
296 carbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197:40-5.
- 297 [15] Haugland RP. Introduction to fluorescence techniques. In: Spence, MTZ, *The*  
298 *Handbook, A guide to fluorescent probes and labelling technologies*, 10th edn.  
299 Invitrogen Corp., USA 2005; 1–6.
- 300 [16] Garner DL, Pinkel DP, Johnson LA, Pace MM. Assessment of spermatozoal function  
301 using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol Reprod* 1986; 34:127–  
302 38.
- 303 [17] Celeghini ECC, de Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical  
304 Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma,  
305 Acrosomal and Mitochondrial Membranes. *Reprod Dom Anim* 2007; 42: 479–88.
- 306 [18] Rasul Z, Ahmed N, Anzar M. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection  
307 ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology* 2007; 68:  
308 813–9.
- 309 [10] Rao PS, Merilan CP, Sikes JD. Intermediary metabolism of bovine spermatozoa as  
310 influenced by dimethyl sulphoxide, *J. Reprod. Fertil.* 1969;18: 176–7.
- 311 [19] D.Y. Gao, E. Ashworth, P.F. Watson, F.W. Kleinhans, P. Mazur, J.K. Critser,  
312 Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium  
313 chloride, and sucrose on spermolysis, *Biol. Reprod* 1993;112–23.
- 314 [20] Songsasen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA, Leibo SP. 2002.  
315 Osmotic sensitivity of canine spermatozoa, *Cryobiology* 44, 79–90.
- 316 [21] Peña, A.; C. Linde-Forsberg. 2000. Effect of spermatozoal concentration and post-  
317 thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-

318 18.

319

## **CAPÍTULO 3**

## ARTIGO II

**Correlação das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de cães<sup>2</sup>****RESUMO**

O presente estudo visou correlacionar as proteínas do plasma seminal e análise espermática *in vitro* de sêmen de cães pré e pós-descongelação. Vinte ejaculados de 10 cães foram avaliados nos 2 momentos quanto à cinética espermática, concentração, morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, do acrossomo, potencial de mitocôndria e teste de ligação espermática em membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha. Após a avaliação do sêmen, foi feita centrifugação e retirada do plasma seminal. O pellet foi ressuscitado em meio Tris-frutose a 8% de glicerol e criopreservado. Foi realizado análise proteômica do plasma seminal por espectrometria de massas, com abordagem *shotgun*. As proteínas identificadas foram correlacionadas aos resultados da análise das variáveis espermáticas utilizando *clusters* de fertilidade (*cluster Low*, *cluster Medium* e *cluster High*), por avaliação do componente principal, *VIP score* e correlação das variáveis espermáticas com o teste ligação de espermatozoides em membrana perivitelínica. Foi possível identificar as proteínas *matrix metalloproteinase 9* e *epididymal secretory glutathione peroxidase* no *cluster High*, o qual apresentou melhores resultados de congelabilidade e podem estar relacionados a processos de estresse oxidativo, melhorando os índices de congelabilidade neste *cluster*. Concluiu-se que há influência das proteínas presentes de acordo com a qualidade espermática.

**Palavras-chave:** Criopreservação, canino, biomarcador, espermatozoide<sup>1</sup>

---

<sup>2</sup> Artigo redigido segundo as normas da Reproduction in Domestic Animals, ISSN 0936-6768, ranqueada como A2, pelo QUALIS – CAPES de 2016. Normas disponíveis no link: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)14390531/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)14390531/homepage/ForAuthors.html)

## 25    **CONTENTS**

26    The present study aimed to correlate seminal plasma proteins and in vitro sperm analysis  
27    of pre and post-thawing dog semen. Twenty ejaculates from 10 dogs were evaluated at  
28    two moments for spermatic kinetics, concentration, sperm morphology, plasma  
29    membrane integrity, acrosome, mitochondrial potential and sperm binding test on  
30    perivitellineal membrane of chicken egg yolk. After semen evaluation, centrifugation and  
31    removal of seminal plasma were performed. The pellet was resuspended in 8% glycerol  
32    and cryopreserved Tris-fructose medium. Proteomic analysis of the seminal plasma was  
33    performed by mass spectrometry, with a shotgun approach. The proteins identified were  
34    correlated to the results of the analysis of the spermatic variables using clusters of fertility  
35    (Cluster Low, cluster Medium and cluster High), by evaluation of the main component,  
36    VIP score and correlation of sperm variables with sperm binding test in perivitellineal  
37    membrane. It was possible to identify the matrix metalloproteinase 9 and epididymal  
38    secretory glutathione peroxidase proteins in the High cluster, which presented better  
39    freezing results and may be related to oxidative stress processes, improving the freezing  
40    indexes in this cluster. It was concluded that there is influence of the proteins present  
41    according to the spermatic quality.

42    **Keywords: Criopreservation, semen, canine, biomarker**

43

## 44 1 INTRODUÇÃO

45 As ferramentas de biotecnologia avançada, como a proteômica e lipidômica têm auxiliado  
46 a desvendar se o papel do plasma seminal está além do transporte do espermatozoide no  
47 trato reprodutor da fêmea (Carrell, Aston, Oliva, Emery, & Jonge, 2016). A proteômica  
48 pode auxiliar nos estudos a respeito da fisiologia espermática e das lesões causadas pela  
49 criopreservação a fim de minimizá-los (Gao & Critser, 2000; Kordan et al., 2013). Tais  
50 danos à célula espermática são decorrentes ao estresse oxidativo, choque térmico e  
51 reduzem a fertilidade do ejaculado (Wooley & Richardson, 1978; Farstad, 1996; Gao &  
52 Critser, 2000).

53 A análise proteômica do plasma seminal já foi estudada em espécies, como a bovina, na  
54 qual foi descrita como uma ferramenta para predizer a fertilidade (Roncoletta, Morani,  
55 Rodrigues & Francheschini, 2013). Esta correlação foi baseada na presença/ausência e  
56 quantidade de proteínas do plasma seminal (Wolf & Volglmayr, 1984; Vilagran et al,  
57 2013), já que 35% das proteínas aderidas à membrana espermática durante a ejaculação  
58 (Ayyagari, Fazleabas & Dawood, 1987; Killian, Champman & Rogowski, 1993; Frazer  
59 & Bucci, 1996; Moreau & Manjunath, 1999; Roncoletta, Morani, Esper, Barnabe &  
60 Franceschini, 2006) são oriundas do plasma seminal (Russel, Peterson, Hunt & Strack,  
61 1984).

62 A identificação e o conhecimento acerca das proteínas do plasma seminal de cães podem  
63 permitir resultados superiores de congelabilidade e fertilidade e aplica-los a reprodução  
64 de canídeos selvagens.

65 A fim de compreender melhor a fisiologia reprodutiva dos cães, o envolvimento das  
66 proteínas do plasma seminal no espermatozoide durante a congelação do sêmen, este  
67 estudo visou investigar a correlação das proteínas do plasma seminal sobre a,  
68 congelabilidade e ligação *in vitro* do espermatozoide canino.

## 69 2 MATERIAL E MÉTODOS

70 Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
71 (COBEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pela  
72 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), institucional sob protocolo nº 97/2015.

73

### 74 2.1. Animais e colheita do sêmen

75 O sêmen foi colhido de 10 animais (2 ejaculados/animal) de proprietários particulares,  
76 com idade entre 2 a 6 anos, das raças Border Collie, American Bully, Rottweiler e  
77 Australian Cattle Dog, totalizando 20 ejaculados. A colheita foi conduzida por  
78 manipulação digital, sem uma fêmea, utilizando funil de silicone acoplado a um tubo  
79 plástico graduado.

80

### 81 2.2 Colheita e avaliação

82 Após a colheita do ejaculado o sêmen foi avaliado por exames macroscópico (volume),  
83 microscópicos (concentração, cinética e morfologia espermática, potencial mitocondrial,  
84 integridade de membrana plasmática e de acrossomo) e teste de ligação espermática em  
85 membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha (TL).

86 O volume foi avaliado pela graduação do tubo e a concentração espermática em câmara  
87 hematimétrica de Neubauer, após diluição do sêmen em formol-salina tamponado na  
88 proporção de 1:20.

89 A análise da cinética espermática foi efetuada por método computadorizado (Hamilthon-  
90 Thorne Computer-Aided Semen Analyzer, CASA System, versão 10 Ivos, HTR-IVOS  
91 10 Analyzer, Hamilthon Thorne Research, Beverly, MA, USA). Os parâmetros de  
92 configuração do equipamento para a espécie canina estão representados na Tabela 1.

93 Um cálculo derivado do CASA foi realizado de acordo com Agarwal et al. (2003),

94 modificado por Núñez-Martinez et al. (2006):

|                                  |                                                                                                     |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Índice de velocidade espermática | $(VCL \times 0,87) + (VSL \times 0,76) + (VAP \times 0,90) + (ALH \times 0,92)$                     |
| Índice de movimento espermático  | $(VSL \times 0,59) + (VAP \times 0,37) + (LIN \times 0,95) + (STR \times 0,89) + (WOB \times 0,83)$ |

95

96 **TABELA 1** Configuração do sistema CASA usado para analisar as células espermáticas  
97 caninas.

| Parâmetro           | Unidade |
|---------------------|---------|
| Taxa de imagens/seg | 60      |
| Número de imagens   | 50      |
| Contraste mínimo    | 40      |
| Mínimo de células   | 6       |
| Tamanho celular     | 5       |
| Intensidade celular | 45      |
| Cutoff médio VAP    | 60      |
| Cutoff baixo VAP    | 30      |
| STR                 | 70      |
| Cutoff VSL          | 20      |
| Temperatura (°C)    | 38      |
| Câmara usada        | Makler* |

98 \*Makler Counting Chamber, Lexington, KY, USA

99

100 Uma alíquota de sêmen foi utilizada para confecção de um esfregaço em lâmina. A  
101 secagem e fixação em formol-salina, durante 10 minutos, a 37° C, as lâminas foram  
102 coradas pelo método de Karras modificado (Papa et al, 1988). Foram contados 200  
103 espermatozoides e os defeitos foram classificados em maiores e menores (Blom, 1972).  
104 O potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e do acrossomo foram  
105 avaliados por citometria de fluxo.  
106 A avaliação foi feita em aparelho LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA,  
107 USA), equipado com 3 lasers de excitação (violeta: 405 nm 50 mw; azul: 488 nm 50 mw;

108 vermelho: 640 nm 40 mw). As configurações dos filtros para a mensuração da emissão  
109 de fluorescência foram 530/30 nm (FITC-para PSA); 694/50 nm (PerCP-Cy-5.5 para IP);  
110 660/20 nm (APC-para *MitoStatus Red*); e 450/50 nm (Pacific Blue para H342) e a  
111 compensação da auto-fluorescência e dos controles de uma cor foram realizadas para  
112 evitar a sobreposição de ondas.

113 Foram avaliadas 10.000 células/amostra e os gráficos gerados a partir dos resultados da  
114 citometria de fluxo, utilizados para todas as análises.

115 As sondas utilizadas foram 5 µL de Hoescht 3342 (7,0 µM em água destilada), 2,5 µL de  
116 IP (1,5 µM em TALP-PVA), 0,2 µL de FITC-PSA (1,0 ng em solução de 0,01% de azida  
117 de sódio) e 2 µL da sonda *MitoStatus Red* (dimetilsulfóxido-DMSO), na concentração de  
118 20 nM e 2 µL mantidas em banho Maria a 37°C durante 15 minutos. Uma alíquota do  
119 ejaculado foi diluída em TALP-PVA (modificado de Parrish et al., 1988; 100 mM NaCl,  
120 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%,  
121 2,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de  
122 sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil - PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de  
123  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL. As sondas fluorescentes foram incubadas com 200 µL da  
124 mistura.

125 Para o TL foram utilizados anéis médios e grandes (13/5'' e 15/6'') de silicone de uso  
126 ortodôntico (Morelli Ortodontia®, Sorocaba, SP, Brasil). Todos os materiais utilizados  
127 durante este processo foram esterilizados em autoclave.

128 Após a separação da clara, a gema do ovo foi colocada sobre um papel filtro, para a  
129 retirada da clara remanescente. As gemas foram colocadas em placas de petri contendo  
130 pequena quantidade de água ultrapura, foram incisadas ao meio com bisturi e lavadas com  
131 auxílio de seringa até que a membrana perivitelínica ficasse translúcida. Então, a água foi  
132 removida e a membrana lavada e mantida em PBS pH 7,0 estéril (Barbato & Crammer,

1998). Após este processo, os anéis de silicone com diâmetros diferentes, foram envolvidos em fragmentos da membrana perivitelínica e submersos em placas de vidro de 9 poços contendo 400 µL de TCM 199 (GIBCO® Cód. 11150059, ThermoFisher, Nova York, NY, USA) e incubados por 30 minutos em estufa a 38° C (equilíbrio).

Após esta etapa, uma alíquota de sêmen diluída em TCM 199, na concentração de  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides/20 µL foi depositada cuidadosamente sobre o centro dos anéis de silicone e mantidos em estufa a 38°C por 30 minutos (Csemark Jr., 2011). Cada amostra foi avaliada em triplicata.

Para visualização dos espermatozoides ligados à membrana perivitelínica, as células espermáticas contidas sobre a membrana foram coradas com 200 µL Hoescht 33342 (4 mg/mL em D-PBS pH 7,0 estéril), durante 20 minutos. Então, o conjunto de anéis de silicone, contendo a membrana, foi lavado com 400 µL de TCM 199, 4 vezes, para a remoção dos espermatozoides não aderidos.

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência invertido (Leica Biosystems® DMI 3000b), num aumento 1000X. Foram feitas 5 imagens de campos aleatórios em cada conjunto de anéis de silicone com membrana, totalizando 15 imagens/ejaculado, as quais foram armazenadas para posterior contagem com o auxílio do software *Image Processing and Analysis in Java, ImageJ* (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012).

151

### 152 2.3. Congelação e descongelação do sêmen

Após as análises, o sêmen foi centrifugado a 800g, durante 10 minutos, o plasma seminal foi alíquotado e armazenado à -20° C até a análise proteômica.

O *pellet* resultante foi ressuspendido em meio diluente TRIS-frutose contendo 8% de glicerol (Morton, 1988 modificado por Chirinea et al., 2006), numa concentração de  $100 \times 10^6$ /mL, envazado em palhetas francesas de 0,5 mL. As palhetas foram refrigeradas

158 (equilíbrio) durante 1 hora, numa temperatura constante de 5°C, posteriormente mantidas  
159 sob o vapor de nitrogênio (6 cm), durante 20 minutos para congelação. As palhetas foram  
160 armazenadas em botijão de nitrogênio líquido. A descongelação do sêmen foi realizada a  
161 70°C, por 8 segundos.

162

#### 163 2.4. *Proteínas do plasma seminal*

164 O plasma seminal armazenado foi descongelado em banho de gelo e recentrifugado a  
165 10.000g, durante uma 1 hora à 5° C, o sobrenadante foi recolhido e a concentração de  
166 proteínas totais foi determinada em duplicata, pelo método colorimétrico de ácido  
167 bicinconínico (BCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, CO, USA), segundo as instruções do  
168 fabricante. A leitura foi realizada em nanoespectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo  
169 Fisher Scientific Inc, Waltham, USA). Os valores foram expressos em µg/µL, baseados  
170 numa curva padrão confeccionada a partir de concentrações conhecidas de albumina  
171 bovina.

172 A digestão *in solution* das amostras de plasma seminal foi realizada de acordo com Villén  
173 e Gigy (2008), com modificações.

174 Foi utilizado um total de 50 µg de proteína total do plasma seminal, o qual foi  
175 ressuspensa em 8M de solução aquosa de ureia (1: 2), seguido da redução das pontes  
176 dissulfeto com 5 mM de DTT em bicarbonato de amônio 50 mM (solução aquosa), por  
177 25 minutos a 56° C. As amostras foram alquiladas com 14 mM de iodoacetamida em  
178 bicarbonato de amônio 50 mM, na solução final, por 30 minutos, à temperatura ambiente,  
179 protegidas da luz. O excesso de iodoacetamida livre (*quench*) foi realizado, adicionando-  
180 se 5 mM de DTT em bicarbonato de amônio 50 mM na solução final, por 15 minutos, em  
181 ambiente protegido da luz, na temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 50  
182 mM de bicarbonato de amônio (1: 5) para reduzir a concentração da ureia para 1,6 M e

183 acrescida de 1 mM de solução aquosa de  $\text{CaCl}_2$  na solução final. A seguir, uma solução  
184 de 20 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina (proporção de 1: 50 de enzima: substrato) foi adicionada a  
185 amostra. As amostras foram incubadas durante 16 h, a 37° C, em estufa com temperatura  
186 controlada. Ao final, a ação enzimática da tripsina foi interrompida com 0,4 % de ácido  
187 trifluoroacético diluído em solução aquosa (TFA) e o pH verificado (< 2,0). Então, as  
188 amostras foram centrifugadas a 2.500g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, o  
189 sobrenadante recolhido e a dessalinização dos peptídeos foi realizada em colunas de fase  
190 reversa (SepPack C18 WAT054955, Waters Corporation, Massachusetts, USA), de  
191 acordo com a instrução do fabricante.

192 Após a dessalinização, o volume foi reduzido (~1  $\mu\text{L}$ ) em concentrador (SPD1010  
193 Integrated SpeedVac™ Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e  
194 as amostras armazenadas a -20° C até a análise por espectrometria de massas.

195 Para espectrometria de massas, as amostras foram descongeladas, diluídas em ácido  
196 fórmico 0,1% na proporção de 0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , homogeneizadas em agitador de tubos e  
197 centrifugação a 1.100g por 5 minutos. Foi pipetado 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e depositado  
198 no *clear glass 12 x 32 mm screw neck total recovery vial* com tampa (Waters Corporation,  
199 Milford, Massachusetts, EUA).

200 A análise de proteínas foi realizada de acordo com Aragao et al., 2012, uma alíquota de  
201 4.5  $\mu\text{L}$  de proteínas resultante da digestão peptídica foi separada pela coluna C18 (100  
202  $\mu\text{m}$  x 100 mm) RP nano UPLC (nanoAcquity, Waters) acoplado ao espectrômetro de  
203 massas Q-TofPremier (Waters) com nanoeletrospray com uma taxa de fluxo de 0.600  
204  $\mu\text{L}/\text{min}$ . O gradiente foi com 2 a 90% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico durante  
205 45 minutos. A voltagem do nanoeletrospray foi de 3.5 kV, o cone de voltagem de 30  
206 V em 100 uC. O aparelho foi operado no modo "top três", no qual um espectro MS foi  
207 adquirido seguido por MS / MS dos três picos mais intensos detectados. Após a

208 fragmentação de MS / MS, o ion foi colocado na lista de exclusão durante 60 s e para a  
209 análise de peptídeos de clivagem endógena, utilizou-se uma exclusão em tempo real. Os  
210 espectros foram adquiridos usando o software MassLynx v.4.1 e os arquivos de dados  
211 brutos foram convertidos para um formato de lista de picos (mgf) sem somar os scans a  
212 partir do software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd) com  
213 carbamidometilação com modificações fixadas, oxidação em metionina com modificação  
214 viarável, uma clivagem de tripsina, e tolerância de 0.1 Da para os íons precursores de  
215 fragmento.

216 A anotação da ontologia gênica de cada proteína foi obtida no UniprotKB  
217 ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), Boutet et al., 2016) usando as categorias função molecular, processo  
218 biológico e componente celular, utilizando a taxonomia *Canis lupus familiaris*. As figuras  
219 referentes à ontologia gênica foram obtidas online no endereço  
220 <http://www.pantherdb.org>, Panther version 10 (Huaiyu et al., 2016).

221

## 222 2.5. Análise estatística

223 Os resultados das variáveis espermáticas, como cinética, potencial mitocondrial,  
224 integridade de membrana plasmática e do acrossomo e número de espermatozoides  
225 ligados a membrana perivitelínica nos momentos pré e pós-descongelado foram  
226 apresentados em média  $\pm$  erro padrão e mediana (mínimo e máximo).

227 As variáveis de cinética espermática, potencial mitocondrial, integridade de membrana  
228 plasmática e acrossomo, número de espermatozoides ligados à membrana perivitelínica  
229 foram utilizadas para análise de *cluster*, pelo software *Metabolomic Data Analysis with*  
230 *MetaboAnalyst 3.0*. A diferença entre os *clusters* pré e pós-descongelação foi analisada  
231 pelo software Sigma Plot for Windows, v. 11.0, 2008, Systat Software Inc. A distribuição  
232 das variáveis foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e os dados paramétricos

foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, e quando não paramétricos submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn, para determinar diferenças significativas em todas as variáveis entre *clusters* pré e pós-descongelamento. A diferença entre cada *cluster* pré e pós-descongelamento foi analisada pelo teste t. O nível de significância considerado foi  $p < ,05$ .

Os resultados da análise proteômica do plasma seminal foram apresentados de maneira descritiva, identificando presença e ausência das proteínas em cada grupo.

A análise de estatística multivariada da cinética espermática, potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e de acrossomo e teste de ligação foi realizado pelo software online *MetaboAnalyst* 2.0 (Xia; Wishart, 2016). Para análise foi usado o componente principal (PCA) para descrição da variação de amostras.

Foi realizada correlação dessas variáveis, analisadas por teste de correlação de Spearman. O coeficiente de correlação foi classificado como nulo ( $r = 0$ ), baixo ( $0 < r \leq 0.30$ ), moderado ( $r = 0.30 < r \leq 0.70$ ) e alto ( $0.7 < r \leq 1$ ) (Levine, Stephan, Krehbiel & Berenson, 2013).

#### 4 RESULTADOS

A Tabela 1 representa os resultados (média  $\pm$  erro padrão e mediana, mínimo e máximo) obtidos de todos os ejaculados na análise da cinética espermática, potencial mitocondrial e integridade de membrana plasmática e do acrossomo e a Tabela 2 representa os mesmos parâmetros divididos entre os *clusters*.

Após a análise estatística das variáveis foram formados 3 *clusters*, sendo considerados de acordo com a qualidade espermática em *medium* (*cluster* M,  $n = 6$ ), *high* (*cluster* H,  $n = 10$ ) e *low* (*cluster* L,  $n = 4$ ).

O componente principal (PCA) foi identificado a partir das variáveis espermáticas nos

clusters M, cluster H e cluster L, a soma dos eixos (componente 1 e componente 2) foi de 57,9% representando a significância da divisão dos clusters (Figura 1)

Pelo escore VIP (*variable importance in projection*) as variáveis mais relevantes (VIP escore > 1,0) em ordem de importância foram células estáticas (alto no cluster L), espermatozoides rápidos (alto no cluster H), motilidade progressiva (alto no cluster H), motilidade total (alto no cluster H), espermatozoides lentos (alto no cluster L), número de espermatozoides ligados à membrana perivitelínica (alto no cluster H), integridade de membrana plasmática e acrossomo e alto potencial mitocondrial (alto no cluster L), espermatozoides com velocidade média e potencial mitocondrial baixo (alto no cluster L; Figura 2).

A correlação do teste de ligação com os resultados da cinética espermática, potencial mitocondrial e integridade de membrana plasmática e do acrossomo após descongelação está representada na Figura 3. Foram encontradas correlações negativas moderadas entre o teste de ligação espermática e espermatozoides estáticos, ALH e ELON; e positiva moderada com a motilidade progressiva, espermatozoides rápidos, motilidade total, integridade de membrana plasmática e acrossomo.

A análise proteômica do plasma seminal identificou 38 proteínas (Tabela 4). Foram encontradas 21, 23 e 20 proteínas nos clusters M, H e L, respectivamente. A albumin, arginine esterase, cadherine EGF LAG seven pass G, epididymal secretory protein, fer 1 like protein 5, glutamate rich protein 6B, hemoglobina subunit alpha, polyhomeotic like protein 3, sêrum albumin e trypsin foram encontradas em todos os clusters.

Considerando todos os clusters (Figura 4), a ontologia gênica identificou como principal função molecular a atividade catalítica; como componente celular, a matrix extracelular; processo biológico, o processo metabólico; e as principais classes de proteínas, as hidrolases e moduladores enzimáticos na mesma frequência. No cluster M a ontologia

283 gênica identificou como principais funções moleculares de ligação e atividade catalítica  
284 na mesma frequência; processo biológico foi encontrado proteínas relacionadas a  
285 processos metabólicos e em classe de proteínas a principal proteína sendo enzimas  
286 moduladoras. No *cluster* H, a função molecular encontrada em maior abundância foi  
287 atividade catalítica; processo biológico foram proteínas relacionadas a processos  
288 metabólico; componente celular predominantemente de matrix extracelular; classe de  
289 proteínas na mesma frequência encontrou-se enzimas moduladoras e proteínas  
290 relacionadas a hidrolase. No *cluster* L, função molecular relacionada a ação catalítica e  
291 na mesma proporção, proteínas de ligação; como processo biológico, localização e  
292 processos metabólicos (40% cada); classe de proteínas proteínas ligadoras de cálcio,  
293 enzimas moduladoras, hidrolase, isomerase, receptores, moléculas sinalizadoras e  
294 proteínas carreadoras de transferinas, todas na mesma frequência.

295 A descrição das 38 proteínas encontradas neste estudo, massa molecular, escore, função  
296 molecular, processo biológico e componente celular estão representados na Tabela 4.

297

**TABELA 1** Média  $\pm$  erro padrão, mediana das variáveis espermáticas do ejaculado pré e pós- descongelação, respectivamente.

| Variável                | Pré-congelação  |                       | Pós-descongelação |                      |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
|                         | Média $\pm$ EP  | Mediana (Min – Max)   | Média $\pm$ EP    | Mediana (Min – Max)  |
| MT (%)                  | 87,8 $\pm$ 1,5  | 90,5 (72,0 - 95,0)    | 52,6 $\pm$ 5,8    | 61,0 (2,0 - 79,0)    |
| MP (%)                  | 68,5 $\pm$ 2,1  | 69,0 (44,0 - 80,0)    | 40,0 $\pm$ 4,8    | 43,5 (1,0 - 66,0)    |
| VAP ( $\mu\text{m/s}$ ) | 127,2 $\pm$ 3,4 | 129,5 (84,0 - 145,0)  | 81,0 $\pm$ 2,1    | 82,0 (58,0 - 96,0)   |
| VSL ( $\mu\text{m/s}$ ) | 109,0 $\pm$ 3,4 | 109,0 (67,0 - 132,0)  | 71,6 $\pm$ 2,1    | 72,0 (47,0 - 86,0)   |
| VCL ( $\mu\text{m/s}$ ) | 180,5 $\pm$ 4,9 | 180,0 (127,0 - 227,0) | 105,0 $\pm$ 5,4   | 110,0 (14,0 - 131,0) |
| ALH ( $\mu\text{m/s}$ ) | 6,0 $\pm$ 0,2   | 6,0 (4,0 - 8,0)       | 4,7 $\pm$ 0,3     | 4,0 (4,0 - 8,0)      |
| BCF (Hz)                | 25,1 $\pm$ 0,7  | 25,0 (15,0 - 29,0)    | 21,1 $\pm$ 0,6    | 20,5 (15,0 - 26,0)   |
| STR (%)                 | 84,3 $\pm$ 0,9  | 84,0 (77,0 - 93,0)    | 87,6 $\pm$ 0,5    | 88,0 (81,0 - 90,0)   |
| LIN (%)                 | 61,7 $\pm$ 2,2  | 60,5 (44,0 - 80,0)    | 66,3 $\pm$ 1,1    | 67,0 (53,0 - 73,0)   |
| ELON (%)                | 60,2 $\pm$ 1,3  | 59,0 (52,0 - 72,0)    | 57,6 $\pm$ 1,4    | 57,5 (44,0 - 71,0)   |
| AREA (%)                | 8,9 $\pm$ 0,6   | 8,0 (6,0 - 19,0)      | 6,4 $\pm$ 0,3     | 6,0 (5,0 - 12,0)     |
| RAP (%)                 | 83,2 $\pm$ 2,1  | 86,0 (58,0 - 93,0)    | 44,3 $\pm$ 5,4    | 47,0 (1,0 - 74,0)    |
| MED (%)                 | 3,9 $\pm$ 0,7   | 3,0 (1,0 - 15,0)      | 9,1 $\pm$ 1,0     | 9,0 (1,0 - 16,0)     |
| SLOW (%)                | 9,1 $\pm$ 1,2   | 7,5 (3,0 - 25,0)      | 35,3 $\pm$ 2,7    | 34,0 (20,0 - 60,0)   |
| STA (%)                 | 0,6 $\pm$ 0,2   | 0,0 (0,0 - 3,0)       | 9,2 $\pm$ 4,4     | 3,0 (0,0 - 73,0)     |
| MPAI (%)                | 71,6 $\pm$ 3,8  | 78,5 (35,0 - 88,0)    | 20,8 $\pm$ 2,9    | 19,5 (3,0 - 63,0)    |
| MPAIHPM (%)             | 68,4 $\pm$ 3,8  | 71,0 (33,0 - 87,0)    | 13,7 $\pm$ 2,8    | 11,0 (1,0 - 54,0)    |

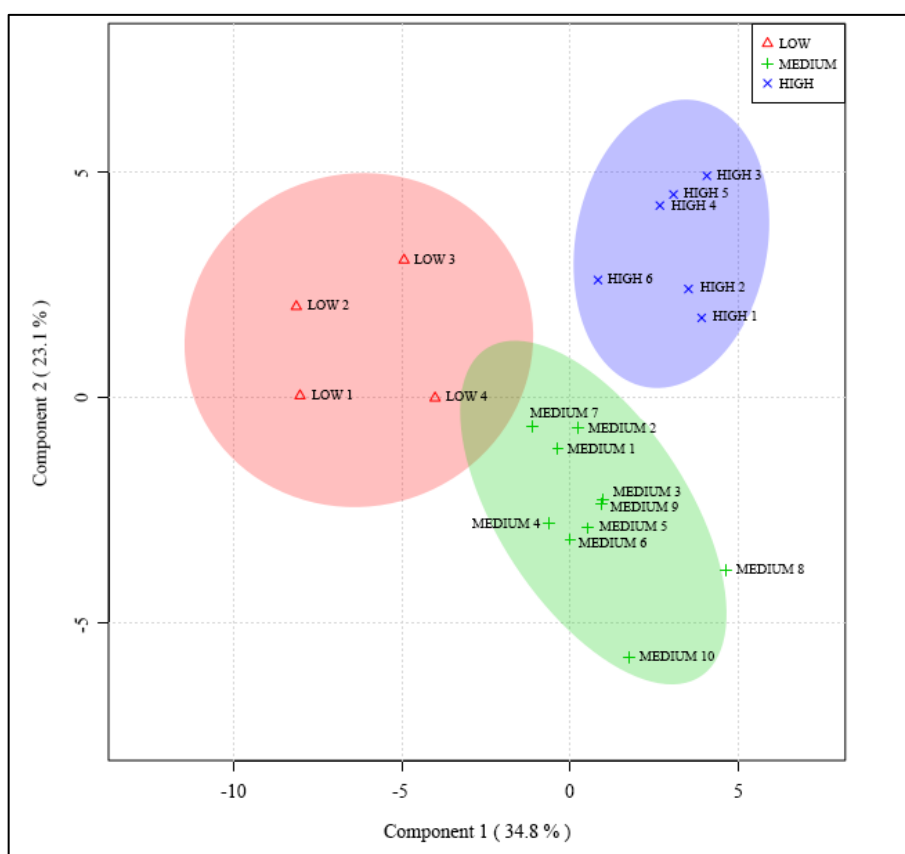
Motilidade total (MT), motilidade progressivo (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média (VAP), velocidade linear (VSL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), batimento cruzado (BCF), Retilinearidade (STR), linearidade (LIN), índice de oscilação (WOB), índice de velocidade (INDVEL), índice de movimento (INDMOV), rápidos (RAP), médios (MED), lentos (SLOW), estáticos (STA), membrana plasmática e do acrossomo íntegra (MPAI), membrana plasmática e do acrossomo íntegras com alto potencial mitocondrial (MPAIHPM).

**TABELA 2** Média  $\pm$  erro padrão dos resultados dos parâmetros seminais avaliados de 20 ejaculados, comparação entre os grupos pré-congelação e pós-descongelação e comparação entre cada cluster (*Médium* –M, *High*- H e *Low*-L) nos dois momentos (pré-congelação e pós-congelação).

| Variáveis               | Pré-congelação               |                              |                               | Pós-congelação               |                                |                               |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                         | Cluster M                    | Cluster H                    | Cluster L                     | Cluster M                    | Cluster H                      | Cluster L                     |
| MT (%)                  | 81,7 $\pm$ 1,9 <sup>aA</sup> | 92,0 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>  | 86,2 $\pm$ 4,8 <sup>abA</sup> | 53,5 $\pm$ 4,8 <sup>aB</sup> | 69,4 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>    | 9,2 $\pm$ 5,5 <sup>cB</sup>   |
| MP (%)                  | 61,6 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>  | 74,2 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>  | 64,2 $\pm$ 4,6 <sup>abA</sup> | 40,3 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>  | 53,8 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>    | 5,0 $\pm$ 3,7 <sup>bb</sup>   |
| VAP                     | 117,2 $\pm$ 7,6              | 135,8 $\pm$ 3,1 <sup>A</sup> | 124,3 $\pm$ 6,0               | 84,2 $\pm$ 3,3               | 83 $\pm$ 2,4 <sup>B</sup>      | 73,3 $\pm$ 6,0                |
| VSL                     | 100,8 $\pm$ 7,2              | 116,8 $\pm$ 3,9              | 104,1 $\pm$ 6,4               | 74,8 $\pm$ 2,9               | 73,9 $\pm$ 2,2                 | 63,5 $\pm$ 6,7                |
| VCL                     | 168,5 $\pm$ 10,1             | 186,8 $\pm$ 5,8              | 184,3 $\pm$ 11,2              | 114,8 $\pm$ 4,3              | 98,2 $\pm$ 9,5                 | 109,1 $\pm$ 9,4               |
| ALH                     | 6,2 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>  | 6,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>   | 6,5 $\pm$ 0,5                 | 5,1 $\pm$ 0,1 <sup>aB</sup>  | 4,5 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>    | 7,1 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>    |
| BCF                     | 24,8 $\pm$ 2,0               | 25,9 $\pm$ 0,7               | 25,6 $\pm$ 1,5                | 21,2 $\pm$ 0,8               | 21,3 $\pm$ 0,6                 | 22,3 $\pm$ 2,6                |
| STR                     | 84,2 $\pm$ 2,0               | 85 $\pm$ 1,1                 | 82,2 $\pm$ 2,0                | 88 $\pm$ 0,7                 | 88 $\pm$ 0,3                   | 85,7 $\pm$ 1,9                |
| LIN                     | 60,6 $\pm$ 4,8               | 63,8 $\pm$ 2,7               | 58 $\pm$ 4,5                  | 66,1 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>  | 68,9 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>    | 59,7 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>   |
| ELON                    | 57,3 $\pm$ 1,8               | 59,7 $\pm$ 1,6               | 65,7 $\pm$ 3,1                | 58,3 $\pm$ 1,2 <sup>ab</sup> | 60 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>      | 50,5 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>   |
| AREA                    | 10,7 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>  | 8,9 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>   | 8,6 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>    | 6,3 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>   | 6,8 $\pm$ 0,1 <sup>B</sup>     | 7,5 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>    |
| RAP                     | 76,1 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>  | 88,6 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>  | 80,2 $\pm$ 6,5 <sup>abA</sup> | 44,6 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>  | 59,6 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>    | 5,5 $\pm$ 3,5 <sup>BB</sup>   |
| MEDIUM                  | 6,8 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>   | 2,8 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>   | 2,2 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>   | 9 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>    | 10,5 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>    | 4,2 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>    |
| SLOW                    | 15,6 $\pm$ 2 <sup>a</sup>    | 7,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>   | 3,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>    | 41,4 $\pm$ 3,5               | 29,1 $\pm$ 2,9                 | 38,2 $\pm$ 8,7                |
| STATIC                  | 1,6 $\pm$ 0,3 <sup>a c</sup> | 0,1 $\pm$ 0,1 <sup>bb</sup>  | 0,25 $\pm$ 0,25 <sup>bc</sup> | 3,3 $\pm$ 0,8                | 1,8 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>    | 51,25 $\pm$ 13,7 <sup>b</sup> |
| WOB                     | 70,0 $\pm$ 4,0               | 72,7 $\pm$ 2,5 <sup>A</sup>  | 67,7 $\pm$ 3,4                | 73,4 $\pm$ 1,3               | 127,5 $\pm$ 50,8 <sup>aB</sup> | 67,4 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>   |
| INDVEL                  | 215 $\pm$ 12,8               | 236,1 $\pm$ 7,4              | 202,5 $\pm$ 18,7              | 134,2 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup> | 135,6 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>   | 117,7 $\pm$ 6,7 <sup>b</sup>  |
| INDMOV                  | 334,5 $\pm$ 18,9             | 378,7 $\pm$ 8                | 357,4 $\pm$ 15,9              | 237,5 $\pm$ 8,7              | 220,5 $\pm$ 9,1                | 215,7 $\pm$ 18,6              |
| MPAI                    | 70,8 $\pm$ 7,3 <sup>ab</sup> | 79,5 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>  | 54,7 $\pm$ 9,4 <sup>b</sup>   | 22,6 $\pm$ 4,2               | 23,0 $\pm$ 5,0                 | 14,5 $\pm$ 3,9                |
| MPAI HPM                | 66,4 $\pm$ 7,2 <sup>ab</sup> | 76,5 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>  | 52,7 $\pm$ 9,0 <sup>ba</sup>  | 16,4 $\pm$ 4,2               | 16,1 $\pm$ 4,7                 | 4,9 $\pm$ 1,5 <sup>B</sup>    |
| TL (x10 <sup>3</sup> )* | 6,0 $\pm$ 1,85               | 5,38 $\pm$ 1,13              | 2,50 $\pm$ 4,08               | 4,24 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup> | 5,54 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>   | 0,83 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>  |

Motilidade total (MT), motilidade progressivo (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média (VAP), velocidade linear (VSL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), batimento cruzado (BCF), Retilinearidade (STR), linearidade (LIN), índice de oscilação (WOB), índice de velocidade (INDVEL), índice de movimento (INDMOV), rápidos (RAP), médios (MED), lentos (SLOW), estáticos (STA), membrana plasmática e do acrossomo íntegra (MPAI), membrana plasmática e do acrossomo íntegras com alto potencial mitocondrial (MPAI HPM). Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p \leq ,05$ ) dentro dos grupos pré-congelado e pós-descongelado. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre os mesmos *clusters* nos momentos pré-congelado e pós-descongelado. \*Número de células contadas

319

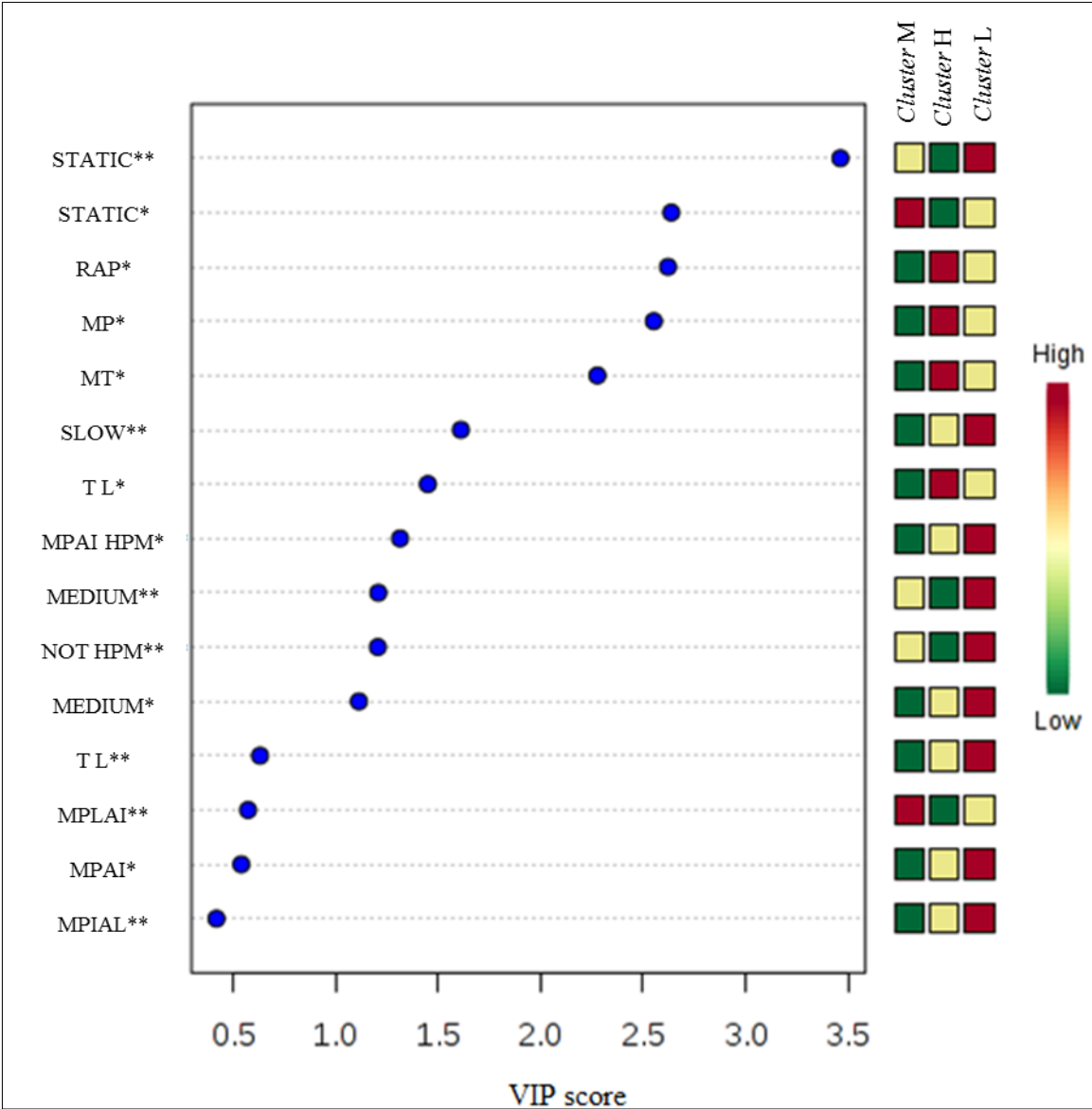


326

327

328 **FIGURA 1** Análise do componente principal (PCA) das mudanças ocorridas em  
 329 cinética espermática, integridade de membrana plasmática, acrossomal, potencial  
 330 mitocondrial, número de espermatozoides ligados a membrana perivitelínica durante a  
 331 criopreservação com sêmen de cães, nos *Clusters Medium, High e Low*

332



333

334 **FIGURA 2** *VIP score (variable importance in projection)* das variáveis mais relevantes  
335 (VIP escore > 1,0) em ordem de importância. (\*) parâmetros avaliados pós-  
336 descongelamento, (\*\*) parâmetros avaliados pré-congelamento.

337 Motilidade total (MT), motilidade progressivo (MP), rápidos (RAP), lentos (SLOW), teste de ligação (TL),  
338 membrana plasmática e do acrossomo íntegras com alto potencial mitocondrial (MPAI HPM), estáticos (STATIC),  
339 ausência de potencial mitocondrial (NOT HPM), médios (Medium), membrana plasmática lesada com membrana do  
340 acrossomo íntegro (MPLAI), membrana plasmática e do acrossomo íntegra (MPAI), membrana plasmática íntegra  
341 com integridade do acrossomo lesada (MPIAL).

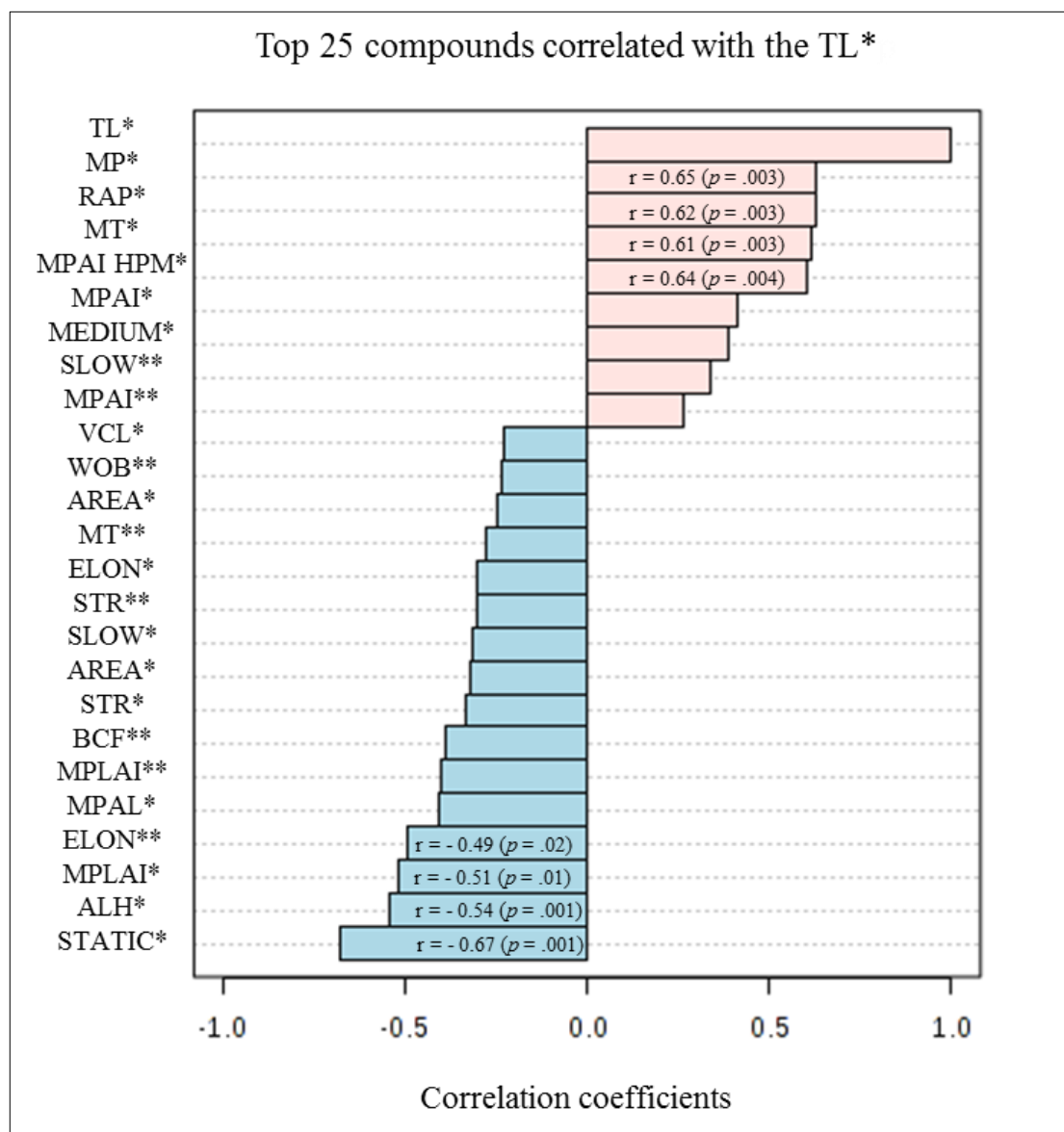
342

343

344

345

346



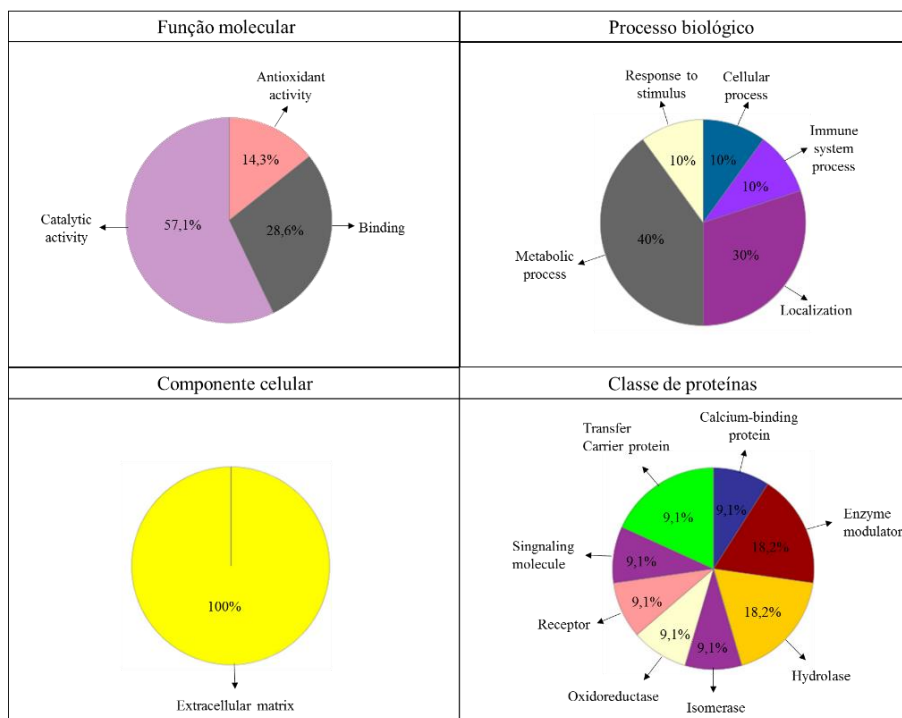
347

348 **FIGURA 3** Correlação do teste de ligação espermática com os resultados da cinética  
 349 espermática, potencial mitocondrial e integridade de membrana plasmática e do  
 350 acrossomo pré e pós-descongelação. (\*) parâmetros avaliados pós-descongelação, (\*\*)
 351 parâmetros avaliados pré-congelação

352

353 **TABELA 3** Expressão diferenciada das proteínas identificadas nos grupos *cluster* M,  
 354 *cluster* H e *cluster* L.

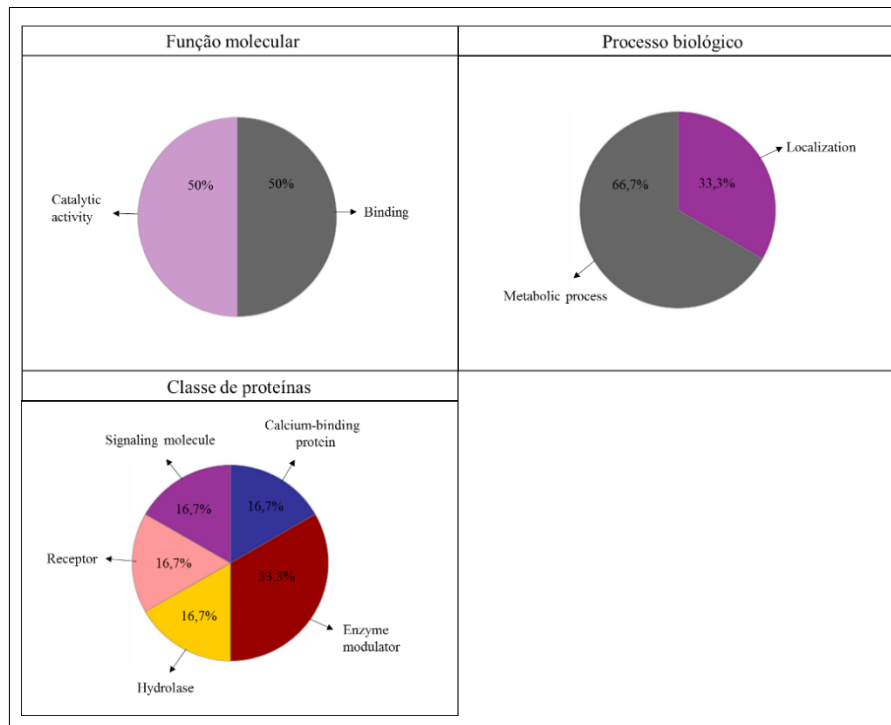
| Proteína                                                           | Cluster M | Cluster H | Cluster L |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Actin cytoplasmic 1                                                | --        | X         | X         |
| Albumin                                                            | X         | X         | X         |
| Alkaline phosphatase                                               | --        | X         | --        |
| Annexin A2                                                         | --        | X         | --        |
| Arginine esterase                                                  | X         | X         | X         |
| Cadherin EGF LAG seven-pass G                                      | X         | X         | X         |
| Calpain-2 catalytic subunit                                        | X         | --        | --        |
| Carboxylesterase 5                                                 | --        | X         | --        |
| Clusterin                                                          | X         | X         | --        |
| Cortactin-binding protein 2                                        | --        | X         | --        |
| Cyclin-dependent kinase 12                                         | --        | --        | X         |
| Cytochrome P450 2D6                                                | X         | --        | --        |
| dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase                                     | X         | --        | --        |
| Epididymal secretory glutathione peroxidase                        | --        | X         | --        |
| Epididymal secretory protein                                       | X         | X         | X         |
| Fer-1-like protein 5                                               | X         | X         | X         |
| Glutamate-rich protein 6B                                          | X         | X         | X         |
| Glyoxalase domain-containing protein 5                             | --        | --        | X         |
| Hemoglobin subunit alpha                                           | X         | X         | X         |
| Inhibitor of growth protein 5                                      | --        | X         | --        |
| Lactotransferrin                                                   | --        | X         | X         |
| Lysozyme C, milk isozyme                                           | --        | X         | --        |
| Matrix metalloproteinase-9                                         | --        | X         | --        |
| Neurobeachin-like protein                                          | --        | --        | X         |
| Nuclear mitotic apparatus protein 1 2                              | --        | X         | --        |
| NFX1-type zinc finger-containing protein 1                         | X         | X         | --        |
| Origin recognition complex subunit 1                               | --        | --        | X         |
| Period circadian protein homolog 1                                 | X         | --        | --        |
| Plastin-2                                                          | --        | X         | X         |
| Pleckstrin                                                         | X         | X         | --        |
| Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, liver/testis isoform | X         | --        | --        |
| Polyhomeotic-like protein 3                                        | X         | X         | X         |
| Protein kinase C-binding protein 1                                 | X         | X         | --        |
| Prostaglandin-H2 D-isomerase                                       | --        | X         | X         |
| Rab11 family-interacting protein 3                                 | --        | X         | --        |
| Roundabout homolog 2                                               | --        | --        | X         |
| Serum albumin                                                      | X         | X         | X         |
| Trypsin                                                            | X         | X         | X         |
| WAP four-disulfide core domain protein 2                           | X         | X         | --        |



356

357 **FIGURA 4** Resumo da ontologia gênica das proteínas encontradas no plasma seminal de  
 358 cães. Imagens obtidas no software livre PANTHER version 10.

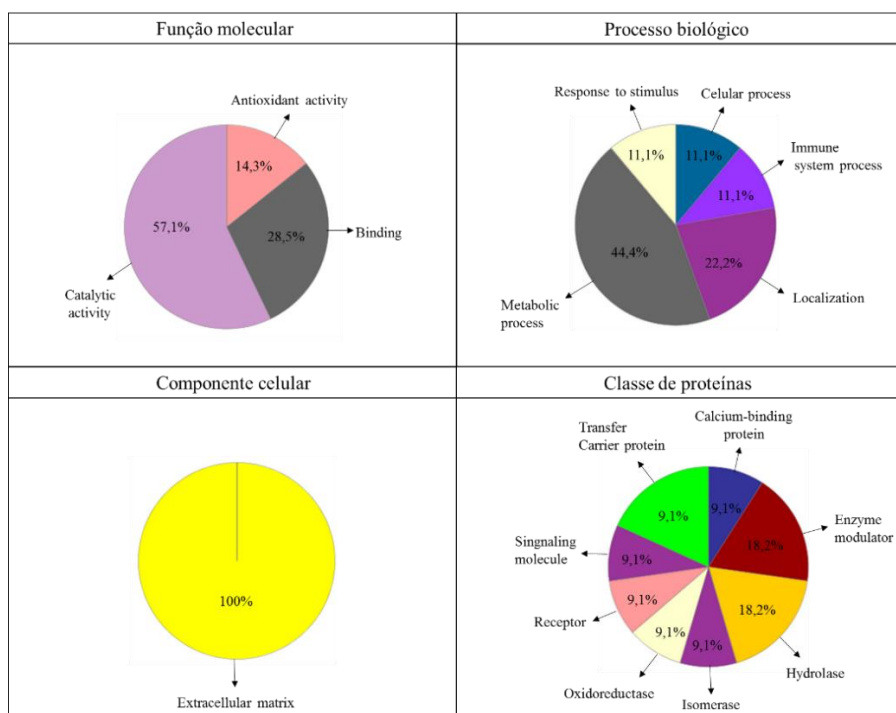
359



360

361 **FIGURA 5** Resumo da ontologia gênica das proteínas encontradas no plasma seminal  
 362 do *Cluster M*. Imagens obtidas no software livre, PANTHER version 10

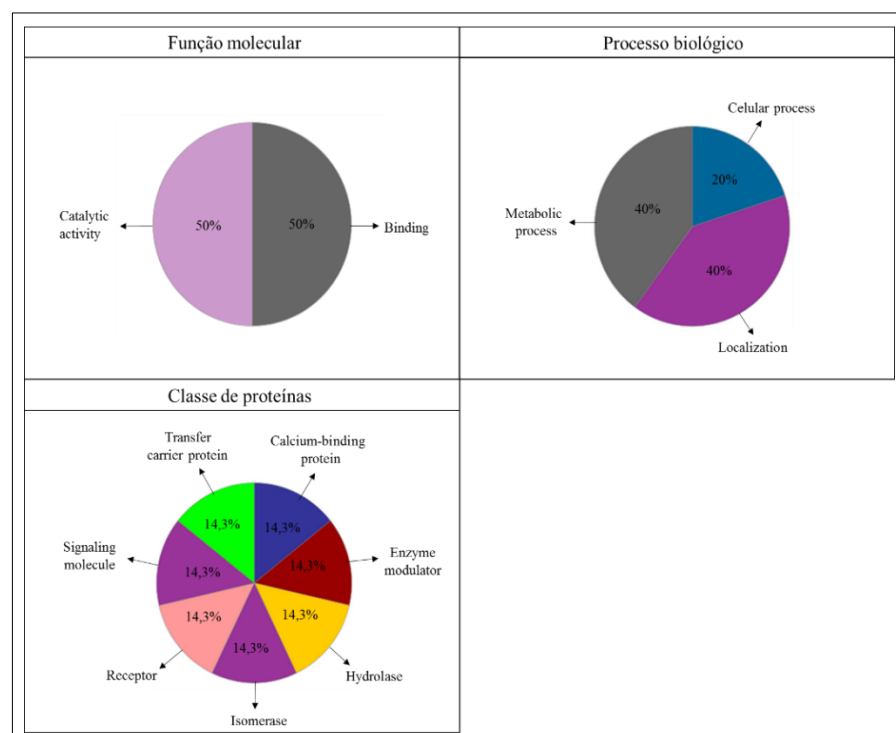
363



364

365 **FIGURA 6** Resumo da ontologia gênica das proteínas encontradas no plasma seminal do  
 366 *Cluster H*. Imagens obtidas no software livre, PANTHER version 10.

367



368

369 **FIGURA 7** Resumo da ontologia gênica das proteínas encontradas no plasma seminal do  
 370 *Cluster L*. Imagens obtidas no software livre, PANTHER version 10.

## 371 5 DISCUSSÃO

372 Para a formação dos *clusters* todas as variáveis pré e pós-descongelação foram analisadas,  
373 foram utilizados os parâmetros de cinética espermática, potencial mitocondrial,  
374 integridade de membrana plasmática e do acrossomo, e número de espermatozoides  
375 ligados à membrana perivitelínica da gema de ovo. Esses resultados foram utilizados para  
376 a separação dos ejaculados em 3 *clusters*.

377 A distribuição do componente principal mostrou a separação distinta e categórica dos 3  
378 *clusters*. O PCA é uma das ferramentas mais importantes para análise multivariada (Lyra,  
379 Silva, Araújo, Fragoso & Veras, 2010) para a realização desta análise é necessário a  
380 transformação das variáveis espermáticas correlacionadas (Lyra, Silva, Araújo, Fragoso  
381 & Veras, 2010). O componente principal revelou somente uma variável do *cluster* M foi  
382 relacionado ao *cluster* L. No entanto, os outros ejaculados se apresentaram de maneira  
383 distinta e segregada em seus respectivos *clusters*.

384 Identificou-se que o *cluster* L pré-congelação apresentou índices de velocidade, potencial  
385 mitocondrial, integridade de membrana plasmática e de acrossomo semelhantes aos  
386 *clusters* M e *cluster* H, sendo considerado ejaculados com boa viabilidade e qualidade  
387 espermática pré-congelação. No entanto, os parâmetros pós-descongelação foram  
388 inferiores no *cluster* L, na maioria dos parâmetros espermáticos, indicando que este grupo  
389 é composto por amostras de baixa resistência a criopreservação, evidenciados pelos danos  
390 a célula espermática quanto a motilidade total e progressiva, MPAI e potencial  
391 mitocondrial. Ademais, neste *cluster*, os valores de espermatozoides ligados à membrana  
392 perivitelínica foram 66% inferiores após a descongelação, quando comparados com a  
393 perda de 30% no *cluster* M e 0% no *cluster* H. Apesar dessa diferença, todos os *clusters*  
394 apresentaram queda nos valores de motilidade total e % de espermatozoides estáticos  
395 devido a criopreservação, pois este processo submete a célula espermática ao estresse

396 osmótico e mudança de temperatura, alteração na fluidez de membrana (Hammerstedt,  
397 Graham & Nolan, 1990).

398 O *VIP score* considerou como os principais parâmetros espermáticos ( $> 1,0$ ) para a  
399 divisão dos *clusters*, os índices de velocidade (% *static*, % *rapid*, % *slow* e % *medium*),  
400 motilidade progressiva e total, número de espermatozoides ligados a membrana  
401 perivitelínica e integridade de membrana plasmática e acrossomo com alto potencial  
402 mitocondrial. Em vista destes resultados, considerou-se que a motilidade espermática foi  
403 um importante parâmetro na classificação dos *clusters*, identificando os grupos de maior  
404 ou menor crio-resistência. Contudo, também foi observado que a motilidade não pode ser  
405 considerada um parâmetro exclusivo, podendo ser superficial (Henning, Petrunkina,  
406 Harrison & Waberski, 2012). Outras variáveis, como ALH, VSL, VCL, linearidade têm  
407 sido utilizadas como dados complementares para prever a fertilidade (Pauston, Sarkar  
408 & Oates, 1994).

409 É possível considerar que o conjunto de velocidades espermáticas foram importantes para  
410 classificação dos *clusters*, visto que a % de células estáticas foram altas no *cluster* L,  
411 espermatozoides rápidos motilidade total e progressiva altos no *cluster* H, ou seja, os  
412 parâmetros de velocidade foram relevantes para avaliação e classificação espermática.

413 O *cluster* L apresentou valores altos relacionados a membrana plasmática íntegra com  
414 alto potencial mitocondrial, o que pode estar relacionado a hiperativação da célula durante  
415 a criopreservação, esta característica da célula é apresentada pelo batimento acentuado e  
416 irregular da cauda no momento da capacitação (Yanagimachi, 1994)

417 O TL foi uma alternativa encontrada para prever a capacidade de ligação espermática a  
418 zona pelúcida, que de certa maneira indicaria a fertilidade *in vitro* (Barbato, Cramer &  
419 Hammerstedt 1998). Este método foi utilizado em vista da facilidade de execução, quando  
420 comparado ao teste de ligação espermática em zona pelúcida de ovócitos homólogos, já

421 que para isto dependia-se a obtenção dos ovários de cadelas ovariohisterectomizadas.  
422 Além disso, a fisiologia reprodutiva das cadelas, o comprimento e o intervalo do ciclo  
423 estral dificulta a execução do teste de fertilidade *in vivo* nesta espécie (Roszel, 1992).  
424 Adicionalmente, pelos mesmos motivos, os testes de fertilização *in vivo* ainda não são  
425 uma opção para verificar a fertilidade de uma amostra de sêmen (Johnston, 2001; Farstad,  
426 2000). Somado a isto, o TL é menos dispendioso e de fácil execução, quando comparado  
427 aos outros testes citados (Amann, 1989; Zhang et al., 1999; Barbato et al., 1998).  
428 Neste estudo, o *software* Image J foi utilizado para contagem dos espermatozoides no TL,  
429 reduzindo o erro, já que é baseado no tamanho da cabeça da célula, estabelecido pelo  
430 observador e calcula a média de células encontradas num determinado campo. No nosso  
431 conhecimento, este é o primeiro estudo que utiliza este *software* para contagem de células  
432 espermáticas associada ao TL, já que a contagem em outros estudos foram subjetivas em  
433 microscópio (Barbato, Cramer & Hammerstedt 1998; Csemark Junior, 2011; Dias et al,  
434 2013).  
435 Os resultados da correlação dos parâmetros seminais com o TL foram semelhantes aos  
436 do VIP score, confirmando que a cinética espermática é essencial para a ligação do  
437 espermatozoide a zona pelúcida e que TL pode ser um teste de predição da qualidade  
438 espermática. Além disso, a motilidade progressiva, alta % de espermatozoides rápidos,  
439 membrana plasmática e de acrossomo íntegro são necessários para penetração  
440 espermática no ovócito, associado ao alto potencial mitocondrial para produção de ATP  
441 (Turner, 2003).  
442 A correlação negativa da amplitude lateral da cabeça (ALH) associada a baixa linearidade  
443 e velocidade curvilínea (VCL) podem indicar hiperativação da célula (Verstegen, Iguer-  
444 Ouada & Onclin, 2002), característica de células de baixa qualidade e possivelmente de  
445 baixa fertilidade. Também foi plausível a correlação negativa entre o TL e MPLAI, já que

446 a integridade estrutural deve ser plena. Dessa forma, a partir das avaliações de *VIP score*  
447 e correlação, é possível concluir que o movimento espermático foi uma das principais  
448 características para classificação dos *clusters* nos momentos pré e pós-descongelção,  
449 havendo o aumento de células estáticas, lentas e de velocidade média nos *clusters* L e M,  
450 contrariamente, uma elevada % de espermatozoides rápidos e motilidade progressiva e  
451 total igualmente superiores no *cluster* H pós-descongelção. Os valores de motilidade  
452 total e progressiva em conjunto com VCL estão relacionados a fertilidade (Verstegen,  
453 Iguer-Ouada & Onclin, 2002).

454 A *arginine esterase*, produzida por células epiteliais da próstata (Juniewicz et al, 1990),  
455 foi a principal proteína identificada em todos os *clusters*, cuja função ainda é pouco  
456 conhecida. Em cães, corresponde a mais de 90% das proteínas secretadas pela próstata e  
457 30% das proteínas do plasma seminal (Dube, Lazure & Tremblay, 1986). Esta  
458 macromolécula é dependente dos níveis de zinco, devido sua alta afinidade a esses íons.  
459 Pode ser secretada em forma de prostassomos durante a ejaculação (Mogielnicka-  
460 Brzozowska et al., 2015). Essa enzima pode hidrolizar outras proteínas no plasma seminal  
461 (Rosenkranz & Kirdani, 1961).

462 A *albumin* é um componente do plasma seminal, presente também em todos os *clusters*,  
463 cuja função foi relacionada a proteção da célula espermática contra o estresse oxidativo,  
464 atuando concomitantemente com a superóxido dismutase e glutathione peroxidase  
465 (Murase, Imaeda, Yamada & Miyazawa, 2007; González-Cadavid et al., 2014).

466 A *lactotransferin*, secretada pelas células de Sertoli, epitélio do epidídimo e glândulas  
467 sexuais acessórias, tem função molecular de proteína ligadora de heparina (Wakabayashi  
468 et al, 1999) foi identificada neste estudo somente nos *clusters* H e L. É uma proteína  
469 carreadora de ferro, íon responsável pela proteção da célula contra peroxidação lipídica e  
470 crescimento microbiano (Farnaud & Evans, 2003; Domingues, Langoni, Padovani,

471 Gonzales & Fregonezi, 2001). Está relacionada a ligação dos espermatozoides aos  
472 ovócitos (Miranda et al, 1997) e a capacitação *in vitro* (Dutta, Ain, Seshagiri & Karande,  
473 2001).

474 A *epididymal secretory glutathione peroxidase* está presente na matriz extracelular e é  
475 expressa pelas células epiteliais do epidídimo (Vernet, Faure, Dufaure & Drevet, 1997).  
476 Em ratos, essa proteína foi relacionada a fertilização e a maturação espermática (Vernet,  
477 Faure, Dufaure & Drevet, 1997). A glutathione peroxidase atua nas concentrações de  
478 espécies reativas de oxigênio (ROS) (Foresta et al., 2002). No nosso estudo, foi  
479 identificada apenas no *cluster* H, no qual foi encontrado índices superiores de  
480 congelabilidade. Uma hipótese é que esta proteína atue no processo de criopreservação  
481 pela redução de estresse oxidativo da célula espermática, pois seu processo biológico está  
482 relacionado a processos de estresse oxidativo.

483 A *matrix metalloproteinase 9* pertence a um grupo de proteínas dependente de zinco e  
484 cálcio (Hulboy et al., 1997) e foi encontrada apenas no *cluster* H. São proteínas  
485 relacionadas a maturação espermática, fertilidade (Bucham-Shaked et al, 2002), está  
486 relacionada com baixa concentração espermática e pode ser um potencial marcador  
487 molecular de qualidade espermática em cães (Warinrak et al., 2015). Também está  
488 relacionada a motilidade e a células morfolologicamente normais (Tentes et al., 2007) e foi  
489 identificada no plasma seminal de homens (Shimokawa et al., 2002).

490 A *clusterin* foi ausente apenas no *cluster* L, é mediada pela proteína chaperona, já foi  
491 identificado em vários tecidos, e está envolvida na proliferação e adesão celular,  
492 relacionada a fatores pró apoptóticos (Trogakos & Gonos, 2002). Em humanos é  
493 possível se tornar marcador de infertilidade (Salehi et al., 2013).

494 A *alkaline phosphatase* esteve presente apenas no *cluster* H, usualmente é encontrada no  
495 plasma seminal de cães e de outras espécies (Turner & McDornell, 2003), pode ser  
496 marcador de fertilidade, e azoospermia.

497 A ontologia gênica revelou diferenças entre os *clusters*. A função molecular no *cluster* H  
498 foi mais diversificada, com proteínas envolvidas em atividades antioxidantes, de ligação  
499 e atividade catalítica, resultados que podem ser relacionados a índices superiores de  
500 qualidade espermática apresentados por esse grupo. O processo biológico neste *cluster*  
501 também foi mais diversificado quando comparado aos *cluster* M e L, assim como a classe  
502 de proteínas, as quais tem proteínas com funções que podem estar inseridas no processo  
503 de capacitação e fertilidade, como sinalização molecular e proteína ligadora de cálcio.

504

## 505 **6 CONCLUSÕES**

506 Houve diferença das proteínas encontradas de acordo com a congelabilidade espermática,  
507 foi possível correlaciona-los a outros parâmetros seminais. Duas proteínas que podem  
508 atuar no processo de criopreservação, atuando de maneira benéfica as células  
509 criopreservadas são a *matrix metalloproteinase 9* e a *Epididymal secretory glutathione*  
510 *peroxidase*

511

**TABELA 4** Resultados da espectrometria de massas e ontologia gênica das proteínas extraídas de espermatozoides do ejaculado de touros. Ontologia gênica obtida no UniprotKB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

| Name                          | ID     | Score | Mass (Da) | Matches   | Ontologiaa gênica                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                      |
|-------------------------------|--------|-------|-----------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                               |        |       |           |           | Molecular function                                                                                                                 | Biological process                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Cellular compartment                                                                                                                                 |
| Actin, cytoplasmic 1          | Q0PGG4 | 218   | 42064     | 7 (5)     | ATP binding                                                                                                                        | –                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Cytoskeleton; dense body; focal adhesion; plasma membran                                                                                             |
| Alkaline phosphatase          | P09487 | 51    | 57499     | 1 (1)     | Metal ion binding; pyrophosphatase activity                                                                                        | Biominerall tissue development; cellular response to organic cyclic compound; developmental process involved in reproduction; endochondral ossification; osteoblast differentiation; response to antibiotic; response to vitamin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Anchored component of membrane; extracellular exosome; extracellular membrane-bounded organelle; plasma membrane; proteinaceous extracellular matrix |
| Annexin A2                    | P19620 | 46    | 38795     | 3 (1)     | Calcium-dependent phospholipid binding; calcium ion binding; phospholipase inhibitor activity; S100 protein bindin                 | Positive regulation by host of viral process; positive regulation of viral life cycle                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Basement membrane; melanosome                                                                                                                        |
| Arginine esterase             | P09582 | 3818  | 29412     | 139 (120) | Serine-type endopeptidase activity                                                                                                 | This serine protease is found in dog seminal plasma, its exact physiological function is not known<br>Anterior/posterior pattern specification; apical protein localization; cell-cell signaling; central nervous system evelopment; establishment of body hair planar orientation; establishment of planar polarity; establishment of planar polarity of embryonic epithelium; gastrulation with mouth forming second; G-protein coupled receptor signaling pathway; hair follicle development; homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules; inner ear morphogenesis; lateral sprouting involved in lung morphogenesis; locomotory behavior; neural tube closure; neuron migration; orthogonal dichotomous subdivision of terminal units involved in lung branching morphogenesis; planar cell polarity pathway involved in neural tube closure; planar dichotomous subdivision of | –                                                                                                                                                    |
| Cadherin EGF LAG seven-pass G | O35161 | 21    | 335168    | 2 (1)     | Calcium ion binding; G-protein coupled receptor activity; protein dimerization activity; transmembrane signaling receptor activity |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Integral component of plasma membrane; membrane; nucleoplasm; plasma membrane                                                                        |

|                             |        |    |        |       |                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------|--------|----|--------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                             |        |    |        |       |                                                                                                                                | terminal units involved in lung branching<br>morphogenesis; protein localization involved in<br>establishment of planar polarity; regulation of actin<br>cytoskeleton organization; regulation of<br>neurotransmitter secretion; Rho protein signal<br>transduction; signal transduction; wound healing                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                           |
| Calpain-2 catalytic subunit | Q9GLG1 | 18 | 80831  | 5 (1) | Calcium-dependent cysteine-<br>type endopeptidase activity;<br>calcium ion binding                                             | Cellular response to amino acid stimulus; proteolysis;<br>regulation of cytoskeleton organization                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Cytoplasm; dendrite; plasma membrane                                                                                                                                                                                      |
| Carboxylesterase 5A         | Q6AW47 | 56 | 63980  | 5 (2) | Carboxylic ester hydrolase<br>activity                                                                                         | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Extracellular space                                                                                                                                                                                                       |
| Clusterin                   | P25473 | 84 | 52327  | 1 (1) | Chaperone binding; misfolded<br>protein binding; ubiquitin<br>protein ligase binding                                           | Chaperone-mediated protein folding; intrinsic apoptotic<br>signaling pathway; negative regulation of intrinsic<br>apoptotic signaling pathway in response to DNA<br>damage; negative regulation of protein<br>homooligomerization; positive regulation of apoptotic<br>process; positive regulation of intrinsic apoptotic<br>signaling pathway; positive regulation of NF-kappaB<br>transcription factor activity; positive regulation of<br>proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic<br>process; positive regulation of protein ubiquitination<br>involved in ubiquitin-dependent protein catabolic<br>process; protein stabilization; response to misfolded<br>protein | Chromaffin granul; cytosol; endoplasmic<br>reticulum lumen; extracellular space; Golgi<br>apparatus; mitochondrial membrane; nucleus;<br>perinuclear region of cytoplasm; spherical high-<br>density lipoprotein particle |
| Cortactin-binding protein 2 | Q2QLA2 | 36 | 183609 | 1 (1) | Cytoplasm › cell córtex; Cell<br>projection › dendritic spine                                                                  | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Cell córtex; dendritic spine                                                                                                                                                                                              |
| Cyclin-dependent kinase 12  | E1BB50 | 37 | 141183 | 5 (1) | ATP binding; cyclin-<br>dependent protein<br>serine/threonine kinase<br>activity; RNA polymerase II<br>carboxy-terminal domain | mRNA processing; phosphorylation of RNA<br>polymerase II C-terminal domain; regulation of MAP<br>kinase activity; RNA splicing                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Nuclear cyclin-dependent protein kinase<br>holoenzyme complex; nuclear speck                                                                                                                                              |

|                                             |        |     |        |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                          |
|---------------------------------------------|--------|-----|--------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                             |        |     |        |         | kinase activity                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                          |
|                                             |        |     |        |         | Arachidonic acid epoxygenase activity; aromatase activity; drug binding; heme binding; iron ion binding; monooxygenase activity; oxidoreductase activity; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen; oxygen binding; steroid hydroxylase activity | Alkaloid catabolic process; alkaloid metabolic process; arachidonic acid metabolic process; coumarin metabolic process; drug catabolic process; drug metabolic process; heterocycle metabolic process; isoquinoline alkaloid metabolic process; monoterpenoid metabolic process; negative regulation of binding; negative regulation of cellular organofluorine metabolic process; oxidation-reduction process; oxidative demethylation; steroid metabolic process; xenobiotic metabolic process | Endoplasmic reticulum; endoplasmic reticulum membrane; mitochondrion; organelle membrane |
| Cytochrome P450 2D6                         | P10635 | 18  | 56076  | 3 (1)   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                          |
| dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase              | A6QLW2 | 22  | 40926  | 4 (1)   | dTDP-glucose 4,6-dehydratase activity                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Nucleotide-sugar metabolic process                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | —                                                                                        |
| Epididymal secretory glutathione peroxidase | O46607 | 38  | 25550  | 2 (2)   | Glutathione peroxidase activity                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Response to oxidative stress                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Extracellular region                                                                     |
| Epididymal secretory protein                | Q28895 | 320 | 16387  | 12 (11) | Cholesterol binding                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Cholesterol efflux; cholesterol metabolic process; cholesterol transport; intracellular cholesterol transport                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Endoplasmic reticulum; extracellular region; lysosome                                    |
| Fer-1-like protein 5                        | A0AVI2 | 25  | 243975 | 1 (1)   | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Myoblast fusion                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Integral component of membrane; plasma membrane                                          |
| Glutamate-rich protein 6B                   | Q5W0A0 | 47  | 81806  | 3 (2)   | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | —                                                                                        |
| Glyoxalase domain-containing protein 5      | P0C5H0 | 23  | 16856  | 7 (1)   | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | —                                                                                        |
| Hemoglobin subunit alpha                    | P01964 | 26  | 15284  | 8 (1)   | Heme binding; iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter activity                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Hemoglobin complex                                                                       |
| Inhibitor of growth protein 5               | Q9JI69 | 17  | 97091  | 1 (1)   | ATP binding; chromatin binding; DNA binding                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | DNA replication                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Nuclear origin of replication recognition complex                                        |

|                            |        |     |        |       |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                    |
|----------------------------|--------|-----|--------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lactotransferrin           | P08071 | 158 | 79670  | 4 (4) | Heparin binding; iron ion binding; peptidase activity; protein serine/threonine kinase activator activity; serine-type endopeptidase activity | Antibacterial humoral response; antifungal humoral response; bone morphogenesis; innate immune response in mucosa; ion transport; iron ion homeostasis; negative regulation by host of viral process; negative regulation of apoptotic process; negative regulation of ATPase activity; negative regulation of lipopolysaccharide-mediated signaling pathway; negative regulation of osteoclast development; negative regulation of single-species biofilm formation in or on host organism; negative regulation of tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11 production; negative regulation of viral genome replication; negative regulation of viral process; ossification; positive regulation of bone mineralization involved in bone maturation; positive regulation of chondrocyte proliferation; positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; positive regulation of osteoblast differentiation; positive regulation of osteoblast proliferation; positive regulation of protein serine/threonine kinase activity; positive regulation of toll-like receptor 4 signaling pathway; regulation of cytokine production; regulation of tumor necrosis factor production; retina homeostasis | Cell surface; cytoplasm; extracellular exosome; extracellular space; nucleus; protein complex; secretory granule; specific granule |
| Lysozyme C, milk isozyme   | Q6B411 | 102 | 17228  | 2 (2) | Lysozyme activity                                                                                                                             | Cell wall macromolecule catabolic process; cytolysis; defense response to Gram-negative bacterium; defense response to Gram-positive bacterium                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Extracellular space                                                                                                                |
| Matrix metalloproteinase-9 | O18733 | 70  | 79157  | 2 (1) | Metalloendopeptidase activity; zinc ion binding                                                                                               | Collagen catabolic process; leukocyte migration; ossification; proteolysis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Extracellular space; proteinaceous extracellular matrix                                                                            |
| Neurobeachin-like protein  | Q6ZQA0 | 19  | 304471 | 2 (1) | Phospholipid binding                                                                                                                          | Blood coagulation; megakaryocyte development; platelet alpha granule organization; platelet formation; wound healing                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Endomembrane system; endoplasmic reticulum; extrinsic component of membrane                                                        |

|                                            |        |     |        |       |                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------|--------|-----|--------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nuclear mitotic apparatus protein 1 2      | Q14980 | 39  | 239199 | 3 (2) | Structural molecule activity                                                                        | Cell division; establishment of mitotic spindle orientation; lung epithelial cell differentiation; meiotic cell cycle; mitotic nuclear division; nucleus organization                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Apical part of cell; cell cortex; centrosome; chromosome; cytoplasm; cytosol; dendrite; extracellular exosome; Golgi membrane; mitotic spindle; mitotic spindle astral microtubule; mitotic spindle pole; neuronal cell body; nuclear matrix; nucleoplasm; nucleu; spindle; spindle microtubule; spindle pole |
| NFX1-type zinc finger-containing protein 1 | Q9P2E3 | 17  | 225102 | 2 (1) | Poly(A) RNA binding; transcription factor activity, sequence-specific DNA binding; zinc ion binding | —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Nucleus                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Origin recognition complex subunit 1       | Q9JI69 | 27  | 97091  | 2 (1) | ATP binding; chromatin binding; DNA binding                                                         | DNA replication                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Nuclear origin of replication recognition complex                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Period circadian protein homolog 1         | Q8CHI5 | 34  | 137562 | 5 (1) | Chromatin DNA binding                                                                               | Circadian regulation of gene expression; circadian regulation of translation; circadian rhythm; entrainment of circadian clock by photoperiod; histone H3 deacetylation; negative regulation of glucocorticoid receptor signaling pathway; negative regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; negative regulation of JNK cascade; negative regulation of transcription, DNA-templated; negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; posttranscriptional regulation of gene expression.; regulation of circadian rhythm; regulation of cytokine production involved in inflammatory response; regulation of hair cycle; regulation of p38MAPK cascade; regulation of sodium ion transport; transcription, DNA-templated | Cytoplasm, nucleus                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Plastin-2                                  | P13796 | 196 | 70814  | 7 (7) | Actin binding; actin filament binding; calcium ion binding; GTPase binding                          | Actin crosslink formation; actin filament bundle assembly; actin filament network formation; animal organ regeneration; cell migration; extracellular matrix disassembly; positive regulation of podosome assembly;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Actin cytoskeleton; actin filament; actin filament bundle; cytoplasm; cytosol; extracellular exosome; extracellular space; filopodium; focal Adhesion; phagocytic cup; plasma membrane;                                                                                                                       |

|                                                                    |        |    |        |       |                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------|--------|----|--------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                    |        |    |        |       |                                                                                                                                                                                                                              | Protein kinase A signaling; regulation of intracellular protein transport; T cell activation involved in immune response                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | podosome; ruffle; ruffle membrane                                                                                     |
|                                                                    |        |    |        |       |                                                                                                                                                                                                                              | actin cytoskeleton reorganization; cell projection organization; cortical actin cytoskeleton organization; hematopoietic progenitor cell differentiation; integrin-mediated signaling pathway; negative regulation of calcium-mediated signaling; negative regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway; negative regulation of inositol phosphate biosynthetic process; phosphatidylinositol metabolic process; phospholipase C-inhibiting G-protein coupled receptor signaling pathway; platelet aggregation; platelet degranulation; positive regulation of actin filament bundle assembly; positive regulation of actin filament depolymerization; positive regulation of inositol-polyphosphate 5-phosphatase activity; positive regulation of integrin activation; positive regulation of platelet activation; protein kinase C signaling; protein secretion by platelet; regulation of cell diameter; ruffle organization; thrombin-activated receptor signaling pathway; vesicle docking involved in exocytosis |                                                                                                                       |
| Pleckstrin                                                         | P08567 | 26 | 40499  | 2 (1) | Aphosphatidylinositol-3,4-bisphosphate binding; protein homodimerization activity; protein kinase C binding                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Cytoplasm; cytosol; extracellular region; membrane; ruffle membrane                                                   |
| Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, liver/testis isoform | Q9DB30 | 17 | 46942  | 1 (1) | ATP binding; phosphorylase kinase activity                                                                                                                                                                                   | Glycogen biosynthetic process                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Phosphorylase kinase complex                                                                                          |
| Polyhomeotic-like protein 3                                        | Q8CHP6 | 29 | 106085 | 3 (1) | DNA binding; zinc ion binding                                                                                                                                                                                                | Multicellular organism development                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Actin cytoskeleton; intracellular membrane-bounded organelle; nucleoplasm; nucleus; PcG protein complex; PRC1 complex |
| Protein kinase C-binding protein 1                                 | Q9ULU4 | 28 | 133206 | 1 (1) | Chromatin binding; histone binding; repressing transcription factor binding; RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding; RNA polymerase II transcription corepressor activity; transcription cofactor | Modulation of excitatory postsynaptic potential; positive regulation of dendritic spine development; positive regulation of dendritic spine maintenance; positive regulation of filopodium assembly; regulation of postsynaptic density protein 95 clustering; regulation of transcription, DNA-templated                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Cytoplasm; dendritic shaft; dendritic spine; nucleus                                                                  |

|                                    |        |     |        |        |                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------|--------|-----|--------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                    |        |     |        |        | activity; zinc ion binding                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                       |
| Prostaglandin-H2 D-isomerase       | Q9XS65 | 224 | 21414  | 4 (4)  | Prostaglandin-D synthase activity; retinoid binding; small molecule binding; transporter activity                                                    | Prostaglandin biosynthetic process; regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep; transport                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Extracellular region; extracellular space; Golgi apparatus; nuclear membrane; perinuclear region of cytoplasm; rough endoplasmic reticulum                                                                            |
| Rab11 family-interacting protein 3 | Q8CHD8 | 25  | 120969 | 1 (1)  | ADP-ribosylation factor binding; calcium ion binding; dynein light intermediate chain binding; protein homodimerization activity; Rab GTPase binding | Cytokinesis; endocytic recycling; negative regulation of adiponectin secretion; protein localization to cilium                                                                                                                                                                                                                                                                          | Centrosome; cleavage furrow; endosome; intercellular bridge; intracellular membrane-bounded organelle; membrane; microtubule organizing center; midbody; nucleoplasm; recycling endosome; recycling endosome membrane |
| Roundabout homolog 2               | Q7TPD3 | 15  | 162002 | 6 (1)  | Identical protein binding                                                                                                                            | Axon guidance; axon midline choice point recognition; brain development; homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules; metanephros development; negative regulation of negative chemotaxis; olfactory bulb interneuron development; positive regulation of axonogenesis; retinal ganglion cell axon guidance; Roundabout signaling pathway; ureteric bud development | Axolemma; cell surface; extracellular exosome; integral component of membrane; plasma membrane                                                                                                                        |
| Serum albumin                      | P49822 | 138 | 70556  | 11 (6) | DNA binding; drug binding; fatty acid binding; metal ion binding; pyridoxal phosphate binding; toxic substance binding                               | Cellular response to starvation; hemolysis by symbiont of host erythrocytes; maintenance of mitochondrion location; negative regulation of apoptotic process; transport                                                                                                                                                                                                                 | Extracellular space; protein complex                                                                                                                                                                                  |
| Trypsin                            | P00761 | 163 | 25078  | 3 (3)  | Metal ion binding; serine-type endopeptidase activity                                                                                                | Digestion                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Extracellular space                                                                                                                                                                                                   |

|                                          |        |    |       |       |                                                                                                                                             |   |                      |
|------------------------------------------|--------|----|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------|
| WAP four-disulfide core domain protein 2 | Q28894 | 93 | 13911 | 2 (2) | Aspartic-type endopeptidase inhibitor activity; cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; serine-type endopeptidase inhibitor activit | — | Extracellular region |
|------------------------------------------|--------|----|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------|

---

## 7 REFERÊNCIAS

- Amann, R.P., Shabanowitz, R.B., Huszar, G., Broder, S.J. (1999) In vitro sperm-binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. *J Androl*, 20, 648–654.
- Aragao, A.Z.B., Belloni, M., Simabuco, F.M., Zanetti, M.R., Yokoo, S. (2012) Novel Processed Form of Syndecan-1 Shed from SCC-9 Cells Plays a Role in Cell Migration. *Plos One*, 7, 8.
- Ayyagari, R.R., Fazleabas, A.T., Dawood M.Y. (1987). Seminal plasma proteins of fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Am J Obstet Gynecol*, 157,1528-33.
- Bailey, J., Morrier, A., Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: successes and persisten problems in farm species. *Can J Anim Sci*, 83, 393–401.
- Barbato, G.F., Crammer, P.G. (1998). Hammerstedt, R.H. A Practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction*, 58, 686-699.
- Barratt, C.L.R., Tomlinsom, M.J., Cooke I.D. (1993). Prognostic significance of computerized motility analysis fo *in vivo* fertility. *Fertil. Steril*, 60, 520-525.
- Blom, E. (1972). The ultrastructure of some characterisc sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: VII Symposio Internationale de Zootechia, Milão, Itália, 125-139.
- Cadavid, A.D.J., Alvarez, A., Markert, U.R., Maya, W.C. (2014). Differential protein expression in seminal plasma from fertile and infertile males, *J Hum Reprod Sci*, 7, 206–211.
- Canvin, A.T., Buhr, M.M. (1989) Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85 533–540
- Carrell, D.T., Aston KI, Oliva R, Emery BR, Jonge CJ, 2015: The “omics” of human male

infertility: integrating big data in a systems biology approach, *Cell Tissue Res*, 363, 295–312.

- Chirinéa, V.H., Martins, M.I.M., Souza, F.F., Tebet, J.M., Papa, F.O., Lopes, M.D. (2006). Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Cienc Anim Bras*, 7, 407-15.
- Csemark Junior, A.C. (2011) Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do semen. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- Dias, J.C.O., Santos, A.C.R., Penitente Filho, J.M., Oliveira, G.D., Mendes, V.R.A., Mancio, A.B. (2013). Teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema de ovo após adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92 % e solução tris no sêmen caprino descongelado. *Acta Veterinaria Brasilica*, 7,300-305.
- Domingues, P.F., Langoni, H., Padovani, CR., Gonzales, J.H.A., Fregones, O.B. (2001). Determinação de gordura, proteína, cobre, ferro, manganês, zinco e contagem de células somáticas no leite de vacas com mastite subclínica. *Semina: Ci. Agrárias*, 22, p. 169-174.
- Dube, J.Y., Lazure, C., Tremblay, R.R. (1986). Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. *Clin Invest Med*, 9, 51–54.
- Dutta, B., Ain, R., Seshagiri, P.B, Karande, A.A. (2001) Differential influence of recombinant non-glycosylated and glycosylated glycodelin on human sperm function: comparative studies with hamster sperm. *Reprod Fertil Develop*, 13, 111–118.
- Farnaud, S., Evans, R.W. (2003). Lactoferrinda multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol*, 40, 395–405.
- Farstad, W. (1996) Semen cryopreservation in dog and foxes. *Anim. Reprod. Sci*, 12, 145-

150.

- Foresta, C., Flohé, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F., Maiorino, M. (2002). Male infertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol. Reprod.*, 67, 967–971
- Frazer, G.S., Bucci, D.M. (1996). Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 46, 1389-402.
- Gao, D., Critser, J.K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 41, 187-196.
- Gil-Villa, A.M., Cardona-Maya, W., Agarwal, A., Sharma, R., Cadavid, A. (2010). Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.*, 94, 1465–72
- González-Cadavid, V., Martins, J.A.M., Moreno, F.B., Andrade, T.S., Santos, A.C.L., Monteiro-Moreira, A.C.O., Moreira, R.A., Moura, A.A. (2014). Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology*, 82, 697–707.
- Gomendio, M., Roldan, E.R.S. (2008). Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Dev. Biol.*, 52, 439–447.
- Green, C. E., Watson, P. F. (2001). Comparison of the capacitation like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122, 889–898.
- Henning, H., Petrunkina, A. M., Harrison, R. A., and Waberski, D. (2012). Bivalent response to long-term storage in liquid-preserved boar semen: a flow cytometric analysis. *Cytometry*, 81A, 576–587.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73–88.

- Hori, T., Ichikawa, M., Kawakami, E., Tsutsui, T. (2004). Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 66, 37-41.
- Juniewicz, P.E., Barbolt, T.A., Egy, M.A., Frenette, G., Dube, J.Y., Tremblay, R.R. (1990). Effects of androgen and antiandrogen treatment on canine prostatic arginine esterase. *Prostate*, 17, 101-111.
- Killian, G.J., Chapman, D.A., Rogowski, L.A. (1993) Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, 49, 1202-7.
- Kordan, W., Fraser, L., Wysocki, P., Strzeżek, R., Lecewicz, M., Mogielnicka-Brzozowska, M., Dziekońska, A., Soliwoda, D., Koziorowska-Gilun, M. (2013) Semen quality assessments and their significance in reproductive technology. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16, 823–833.
- Levine, D.M., Stephan, D.F., Krehbiel, T.C., Berenson, M.L. (2013). Estatística: Teoria e Aplicações. 6th ed.LTC, Rio de Janeiro, RJ.
- Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H., (2000). Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, 60, 327–336.
- Lüpold, S., Calhim, S., Immler, S., Birkhead, T.R. (2009). Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proc. R. Soc. B* 276, 1175–1181.
- Lyra, W.S., Silva, E.C., Araújo, M.C.U., Fragoso, M.D., Veras, G. (2010). Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. *Quím. Nova*, 33, 1594-1597.
- Miranda, P.V., Gonzalez-Echeverria, F., Marin-Briggiler, C.I., Brandelli, A., Laquier, J.A., Tezon, J.G. (1997). Glycosidic residues involved in human sperm–zona pellucida binding in vitro. *Mol Hum Reprod*, 3, 399–404.
- Moreau, R., Manjunath, P. (1999). Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. *Bioch Bioph Acta*, 1438, 175-184.

- Murase, T., Imaeda, N., Yamada, H., Miyazawa, K. (2007). Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore in large white boars. *J Reprod Dev*, 53, 853–65.
- Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Carvalho, I.M., Bicudo, S.D., Ramires, P.R.N., Lopes, M.D. (1988). Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). *Arq Bras Med Vet Zoom*, 40, 115–123.
- Paston, M.J., Sarkar, S., Oates, R.P. (1994). Computer-aided semen analysis variables as predictor of male fertility potential. *Archs Androl*, 33, 93-99.
- Roncoletta, M., Morani, E.S.C., Esper, C.R., Barnabe, V.H., Franceschini, P.H. (2006). Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci*, 91, 77-87.
- Roncoletta, M., Morani, E.S.C., Rodrigues, LHR, Francheschini, PH. (2013). *Proteomics* to investigate bull's semen freezability. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, 50, 43-49.
- Rosenkranz, H., Kirdani, E.S. (1961). The proteolytic enzymes of canine prostatic fluids. *Cancer Chemother Rep*, 15, 9–16.
- Roszel, J.F. (1992). Anatomy of the canine uterine cervix. *Comp. Contin. Educ. Prat. Vet.*, 14, 751-61.
- Russell, L.D., Peterson, R.N., Hunt, W., Strack, L.E. (1984). Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol Reprod*, 30, 959-978.
- Salehi, M., Akbari, H., Heidari, M.H., Molouki, A., Murulitharan, K., Moeini, H., Novin, M.G., Aabed, F., Taheri, H. Fadaei, F., Mohsenzadeh, M., Jafari, M., Pirouzi, A., Heidari, R. (2013). Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm

- protamine deficiency and DNA fragmentation. *Molecular Reproduction & Development*, 80, 718–724.
- Shastry, P.R., Hegde, U.C., Rao, S.S. (1977). Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature*, 269, 58-60.
- Shimokawa, K., Katayama, M., Matsuda, Y., Takahashi, H., Hara, I., Sato, H. (2002). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Mol Hum Reprod*, 8, 32–6.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nat Methods*, 9, 671–675.
- Tenenhaus, M. (1998). La regression PLS: theorie et pratique. Paris: Editions Technic.
- Turner R.M. (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J. Androl.* 24, 790–803.
- Tentes I., Simakopoulos, B., Mourvati, E., Diedrich, K., Al-Hasani, S., Nikolettos, N. (2007). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. *J Assist Reprod Genet*, 24, 278–281.
- Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J.P., Drevet, J.R. (1997) Tissue and Developmental Distribution, Dependence Upon Testicular Factors and Attachment to Spermatozoa of GPX5, a Murine Epididymis-specific Glutathione Peroxidase. *Molecular reproduction and development*, 47, 87–98.
- Verstegen, J., Iguer-ouada, M., Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149–179.
- Vilagran, I., Castillo, J., Bonet, S., Sancho, S., Yeste, M., Estanyol, J.M., Oliva, R. (2013) Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, 80, 443–450.
- Villen, J., Gygi, S.P. (2008). The SCX/IMAC enrichment approach for global

phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature*, 10, 1630-1638.

- Warinrak, C., Wu, J.C., Hsu, W.L., Liao, J.W., Chang, S.C., Cheng, F.P. (2015). Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and their Inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in canine testis, epididymis and semen. *Reprod Dom Anim*, 50, 48–57.
- Wakabayashi, H., Matsumoto, H., Hashimoto, K., Teraguchi, S., Takase, M., Hayasawa, H. (1999). Inhibition of iron/ascorbate induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives, *Biosci Biotechnol Biochem*, 63:955–7.
- Westfalewicz, B., Dietrich, M.A., Ciereszko, A. (2015). Impact of cryopreservation on bull (*Bos taurus*) semen proteome. *J. Anim. Sci*, 93, 5240–5253.
- Wolf, D., Voglmayr, J. (1984). Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J Cell Biol*, 98, 1678–1684.
- Wooley, D.M., Richardson, D.W. (1978). Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert*, 53, 389–39.
- Yamaguchi, R., Yamaguchi, Y., Muro, A. (2009). Isotani, K. Tokuhiko, K. Takumi, I. Adham, M. Ikawa, M. Okabe. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse, *Biol. Reprod.*, 81, 142–146.
- Xia, J., Wishart, D.S. (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis Current Protocols in Bioinformatics, 55:14.10.1-14.10.91.
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Hccr, M.G.H., Rodriguez-Martinez, H. (1999). Prediction of Bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from Young dairy bulls entering an AI-program. *J. Androl.*, 22, 253-60.