

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2019.

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^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

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

Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes

Membro

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

Prof^a. Dr^a. 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^a Eunice Oba, Prof^a Fernanda, Prof^a 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

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	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
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2	32
ARTIGO I	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. Introdução	35
2. Material e Métodos	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
3. Resultados	38
4. Discussão	40
Referências	42
CAPÍTULO 3	45
ARTIGO II	45
RESUMO	45
CONTENTS	46
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAL E MÉTODOS	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
4 RESULTADOS	55
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIAS	82

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 congelação, 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.

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506 **6 CONCLUSÕES**

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

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.