

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Patrícia de Alencar Auler

**Relação do perfil proteômico diferencial do plasma seminal de búfalos com a  
longevidade espermática pós descongelamento**

Belo Horizonte  
2018

Patrícia de Alencar Auler

**Relação do perfil proteômico diferencial do plasma seminal de búfalos com a  
longevidade espermática pós descongelamento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de  
Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Marc Roger Jean Marrie Henry

Coorientadores: Helida Monteiro de Andrade e  
Arlindo Alencar Araripe N. Moura

Belo Horizonte  
2018

A924r Auler, Patrícia de Alencar 1986-  
Relação do perfil proteômico diferencial do plasma seminal de búfalos com a  
longevidade espermática pós descongelamento/ Patrícia de Alencar Auler. 2018.  
104 f.íl.

Orientador: Marc Roger Jean Marrie Henry

Coorientadores: Helida Monteiro de Andrade

Arlindo Alencar Araripe Noronha Moura

Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Reprodução Animal

Inclui bibliografia: f. 91-103.

- 1- Búfalo - Teses - 2 - Sêmen - Teses - 3 – Reprodução animal - Teses - I – Henry, Marc  
Roger Jean Marrie – II – Andrade, Helida Monteiro de - III – Moura, Arlindo  
Alencar Araripe Noronha - IV – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária -  
V – Título.

CDD – 636.08926


Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569


## FOLHA DE APROVAÇÃO


**PATRÍCIA DE ALENCAR AULER**

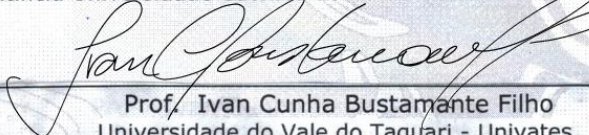
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em REPRODUÇÃO ANIMAL.

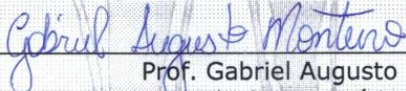
Aprovada em 28 de Junho de 2018, pela banca constituída pelos membros:


  
Prof. Marc Roger Jean Marie Henry  
Presidente - Orientador

  
Prof. Otávio Mitio Ohashi  
Universidade Federal do Pará - UFPA

  
Profª. Maria Isabel Vaz de Melo  
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMINAS

  
Prof. Ivan Cunha Bustamante Filho  
Universidade do Vale do Taquari - Univates

  
Prof. Gabriel Augusto Monteiro  
Escola de Veterinária - UFMG

  
Profª. Hélida Monteiro de Andrade  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

*Ofereço este trabalho a todos aqueles que  
contribuíram para o seu desenvolvimento.*

*Dedico este trabalho para aqueles que nele  
acreditaram e por ele lutaram.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e à espiritualidade, por iluminarem e guiarem meus caminhos.

À minha família, em especial aos meus pais Lúcia e Athos e à minha irmã Juliana, agradeço por todo apoio e incentivo durante esses 4 anos de doutoramento, por sempre respeitarem as minhas escolhas, por acreditarem no meu trabalho e por compartilharem das minhas vitórias e frustrações durante esse período.

Ao Gustavo, a quem dedico esta tese, agradeço imensamente pelo companheirismo, que vai muito além da nossa vida a dois. Discussões intermináveis sobre a reprodução, andrologia e sêmen, que por diversas vezes clarearam minhas ideias e me guiaram a resultados importantes. Ajudante incansável nas atividades de campo e laboratório, nas revisões de textos, e na elaboração deste trabalho. Agradeço pelos conselhos, pelas ideias, pelo conforto nas horas de cansaço e pelo incentivo para os momentos de trabalho. Agradeço especialmente por ter me encantado com a Medicina de Produção, que mudou minha forma de ver a produção animal.

Ao professor Marc Henry, por ter acreditado e confiado em mim durante esse período, pelos infinitos ensinamentos, pelas ajudas nos dias de coleta de sêmen e produção de meio diluidor, por todas as vezes em que fez o impossível para os experimentos acontecerem e por estar sempre disponível para corrigir trabalhos, discutir resultados ou simplesmente conversar. Agradeço por ter lutado comigo por um primeiro projeto, que no início sonhei desenvolver, e por ter confiado a mim um segundo projeto, o qual originou esta tese, pelo qual me apaixonei e que me conferiu grande aprendizado.

Aos amigos e colegas, orientados do professor Marc Henry, Bia, Mayara, Jaci, Guilherme e Verônica, agradeço pela ajuda nos experimentos, pelas discussões de delineamentos e dados, pelo aprendizado em conjunto e por fazerem parte dessa caminhada, tornando-a em certos momentos mais prazerosa.

À Bia, minha parceira inseparável, faço um agradecimento mais que especial, por ter, durante todo esse período, se tornado mais que uma colega de trabalho, mas sim uma grande amiga, me dando apoio e suporte para que eu não fraquejasse diante dos desafios e das dificuldades, e alegrando os meus dias com as nossas aventuras na fazenda e no laboratório, risadas, conversas e desabafos que terminavam em boas gargalhadas. Agradeço por ter se dedicado com tanto carinho e cuidado ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Fazenda Modelo da UFMG, por sempre nos receberem com um bom dia animado e nos ajudarem quando precisamos. Agradeço especialmente ao Marcelino, com quem tanto aprendi sobre a lida com búfalos, por nos receber com aquele sorriso enorme no rosto, faça chuva ou faça sol, e não medir esforços para que conseguíssemos fazer nosso trabalho. Agradeço por sua dedicação e cuidado com os animais, o que permitiu a realização de todos os trabalhos do grupo.

Ao Professor Último, a quem devo inúmeras horas de café, conversas e desabafos, agradeço pelo carinho, por sempre ter uma palavra de conforto e animação, e por me lembrar todos os dias que o amor pelo que se faz transforma o trabalho em lazer.

À minha querida co-orientadora professora Helida, que me acolheu como sua aluna e me tornou parte da equipe do LabLeish. Agradeço por todo o carinho, pelos ensinamentos, pelas discussões e por estar sempre disponível para responder aos meus inúmeros questionamentos, clareando minhas ideias e fazendo os problemas parecerem tão simples.

Aos colegas do Laboratório de Leishmanioses, pela convivência prazerosa e pelas ajudas a qualquer momento. Agradeço especialmente ao Júnior, Simone e Adriana, que participaram ativamente deste trabalho, me auxiliando com a análise proteômica.

Ao professor Arlindo Moura, meu co-orientador, pela sua disponibilidade em me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas da pós-graduação, professores e funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, principalmente aqueles do DCCV e do Setor de Reprodução Animal.

À professora Ângela e ao professor Ivan Sampaio pelas discussões sobre o delineamento experimental dos trabalhos, que me trouxeram um grande aprendizado.

Não menos importantes, agradeço aos animais, nossos búfalos, pelo aprendizado e pela experiência adquirida. Sem eles, este trabalho não teria sido realizado.

A todos que me auxiliaram e estiveram comigo durante esse período.

Muito obrigada!

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as diferenças no perfil proteômico do plasma seminal de búfalos (*Bubalus bubalis*) relacionadas à resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. Para tanto, um total de 118 ejaculados obtidos de 13 touros búfalo foram submetidos ao processo de congelamento de espermatozoides. Previamente ao processamento, uma alíquota de cada ejaculado foi centrifugada para recuperação do plasma seminal para posterior análise proteômica. A resposta dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento foi avaliada a partir dos parâmetros de motilidade e da cinética espermática, fornecidos pelo CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), nos tempos: imediatamente antes do resfriamento (PR), imediatamente antes do congelamento (PC) e após o descongelamento nos tempos 5 (PD\_T5), 60 (PD\_T60), 120 (PD\_T120) e 180 (PD\_T180) minutos. As diferenças no perfil proteômico do plasma seminal foram avaliadas por eletroforese diferencial (*difference in-gel electrophoresis*, DIGE). Para todas as análises, utilizou-se  $p \leq 0,05$ . Grande variação inter e intra-indivíduo foi observada na longevidade da motilidade espermática após o descongelamento, sendo a maior variabilidade observada entre os ejaculados de um mesmo animal. A partir do declínio da motilidade total entre os tempos PR e PD\_T180, foram selecionados os ejaculados que apresentaram maior (grupo de resistência espermática boa\_RB,  $n = 21$ ) e menor (grupo de resistência espermática ruim\_RR,  $n = 19$ ) resistência espermática ao congelamento-descongelamento. Os ejaculados RB e RR foram semelhantes quanto às características espermáticas nas avaliações anteriores ao congelamento, exceto para os parâmetros de velocidade (VCL, VSL, VAP), os quais foram maiores no grupo RB ( $p \leq 0,05$ ). Imediatamente após o descongelamento e durante o período de incubação, os ejaculados RB mantiveram maior velocidade (VCL, VSL, VAP), e apresentaram maior motilidade total e porcentagem de células rápidas em todos os tempos de avaliação ( $p \leq 0,05$ ). Após o descongelamento, principalmente ao final do período de incubação (120 e/ou 180 minutos), o grupo RB também apresentou maiores valores de ALH, STR, BCF e LIN ( $p \leq 0,05$ ). Nove ejaculados RB e oito RR foram selecionados para a análise proteômica. Trinta e quatro *spots* foram diferencialmente intensos nos pools de plasma seminal RBp e RRp, sendo 30 mais intensos no grupo RBp e quatro no grupo RRp ( $p \leq 0,05$ ). Dentre os *spots* de maior intensidade no grupo RBp, 14 apresentaram peso molecular entre 33 e 41 kDa e ponto isoelétrico entre 4,2 e 4,9, respectivamente, e representaram 41,2% do número total de *spots* diferencialmente intensos e 43,8% da intensidade relativa total. Desses 14 *spots*, 12 foram identificados por espectrometria de massas em MALDI-TOF/TOF como Clusterinas. Além disso, dentre os *spots* de maior intensidade no grupo RRp, foi identificada a proteína 14-3-3 zeta/delta. Concluiu-se que os ejaculados de búfalos apresentaram grande variação na resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento, caracterizada por maior sobrevivência e, principalmente, longevidade dos espermatozoides após o descongelamento. Por fim, diferenças no perfil proteômico do plasma seminal foram observadas entre os ejaculados de maior e menor resistência espermática, sendo a proteína clusterina mais abundante no plasma seminal dos ejaculados cujos espermatozoides foram mais resistentes ao processo.

Palavras-chave: Congelamento de espermatozoides, sêmen, proteínas, DIGE



## ABSTRACT

This study aimed to evaluate proteomic profile of seminal plasma of buffaloes (*Bubalus bubalis*) related to sperm resistance to the freezing-thawing process. Therefore, 118 ejaculates of 13 buffalo bulls were submitted to sperm freezing process. Prior to processing, an aliquot of each ejaculate was centrifugated and the seminal plasma recovered for posterior proteomic analyses. Sperm resistance to the freezing-thawing process was evaluated through motility and kinetic parameters, provided by CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), at different moments: just before cooling (PR), just before freezing (PC) and after thawing at five (PD\_T5), 60 (PD\_T60), 120 (PD\_T120) and 180 (PD\_T180) minutes. Differences in proteomic profile were evaluated in difference in-gel electrophoresis (DIGE). For all analyses  $p \leq 0.05$  was considered. Inter and intra-individual variations in post-thaw sperm longevity were observed with the greatest variability presented between ejaculates from the same semen donor. Based on the decline of the total motility between PR and PD\_T180, the ejaculates that presented the highest (group of high sperm resistance – HR,  $n = 21$ ) and the lowest (group of low sperm resistance – LR,  $n = 19$ ) sperm resistance to freezing-thawing were selected. The HR and LR ejaculates presented similar sperm characteristics before freezing, except for velocity parameters (VCL, VSL, VAP), which were higher in the HR group ( $p \leq 0.05$ ). Just after thawing and during the post-thaw incubation period, the HR ejaculates maintained higher velocity (VCL, VSL, VAP) and presented higher values of total motility and rapid cells at all the evaluation times ( $p \leq 0.05$ ). After thawing, especially at the end of the incubation period (120 and/or 180 minutes post-thaw), the HR group also presented higher values of ALH, STR, BCF and LIN ( $p \leq 0.05$ ). Nine HR and eight LR ejaculates were selected to proteomic analysis. Thirty-four spots showed differential intensity in HR and LR pools of seminal plasma, of which 30 were presented in higher intensity in HR group and four in LR group ( $p \leq 0.05$ ). Among the spots with higher intensity in HR group, 14 presented molecular weight between 33 and 41 kDa and isoelectric point of 4.2 to 4.9, respectively. These spots represented 41.2% of the total number of spots with differential intensity and 43.8% of total relative intensity. Of those 14 spots, 12 were identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry as Clusterins. Furthermore, 14-3-3 zeta/delta protein was identified as more abundant in LR group. It was concluded that buffalo ejaculates had great variability in sperm resistance to the freezing-thawing process, which was characterized by higher post-thaw sperm survival and specially longevity. Furthermore, HR e LR ejaculates presented differences in proteomic profile of seminal plasma with higher abundance of Clusterin in the seminal plasma of HR ejaculates.

Keywords: Sperm freezing, semen, proteins, DIGE

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	Representação do desenho experimental .....	37
Figura 2 -	Curva de resfriamento média .....	42
Figura 3 -	Desenho experimental da seleção dos ejaculados para a análise proteômica do plasma seminal .....	45
Figura 4 -	Motilidade total individual ao longo do período compreendido entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento de espermatozoides de búfalo .....	52
Figura 5 -	Média da motilidade total de espermatozoides de búfalos, por animal, ao longo do período compreendido entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento .....	53
Figura 6 -	Média da motilidade total de espermatozoides de búfalos, por animal, antes e após o congelamento e ao final da incubação pós-descongelamento .....	53
Figura 7 -	Declínio médio da motilidade total de espermatozoides de búfalos, por animal, no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim do período de incubação pós-descongelamento .....	54
Figura 8 -	Variação intra-indivíduo do declínio da motilidade total na resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento .....	55
Figura 9 -	Variação intra-indivíduo da motilidade total na resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento .....	57
Figura 10 -	Categorias de ejaculados determinadas a partir da motilidade total ao final do período de incubação após o descongelamento .....	59
Figura 11 -	Representação ( <i>boxplot</i> ) das categorias de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento .....	60
Figura 12 -	Motilidade total em ejaculados RB e RR no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento .....	61
Figura 13 -	<i>Boxplot</i> do declínio da motilidade total ( $\Delta R_{(MT)}$ ) em ejaculados RB e RR ...	62
Figura 14 -	Motilidade total média em ejaculados RB e RR ao longo do período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento .....	64
Figura 15 -	Declínio médio da motilidade total (%) em ejaculados RB e RR no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento .....	66
Figura 16 -	Parâmetros da cinética espermática, avaliados no CASA, no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-	67

	descongelamento, entre ejaculados de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) .....	
Figura 17 -	Motilidade total individual e média por grupo, em ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	69
Figura 18 -	Avaliação da qualidade das proteínas do plasma seminal dos ejaculados de búfalos classificados de acordo com a resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento .....	71
Figura 19 -	Perfil proteômico individual do plasma seminal recuperado de ejaculados de búfalos classificados de acordo com a resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento .....	73
Figura 20 -	Reprodutibilidade do perfil proteômico do plasma seminal entre ejaculados do mesmo animal .....	74
Figura 21 -	Análise de agrupamentos do perfil proteômico do plasma seminal dos ejaculados classificados como sendo de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento .....	75
Figura 22 -	Perfil proteômico de pool de plasma seminal recuperado de ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	77
Figura 23 -	Perfil proteômico diferencial de pool de plasma seminal de ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	78
Figura 24 -	Perfil global de intensidade dos <i>spots</i> em gel 2D-DIGE preparado a partir de pools de plasma seminal recuperado de ejaculados de resistência espermática boa (RBp) e ruim (RRp) ao processo de congelamento-descongelamento .....	79
Figura 25 -	Representação dos <i>spots</i> diferencialmente intensos nos pools de plasma seminal de ejaculados de resistência espermática boa (RBp) e ruim (RRp) ao processo de congelamento-descongelamento .....	81
Figura 26 -	<i>Spots</i> diferencialmente intensos, em gel 2D-DIGE, nos pools de plasma seminal de ejaculados de resistência espermática boa (RBp) e ruim (RRp) ao processo de congelamento-descongelamento .....	82

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Dados climáticos médios do período experimental .....	38
Tabela 2 -	Idade, peso e escore corporal, perímetro escrotal e consistência testicular dos 13 touros búfalos ( <i>Bubalus bubalis</i> ) utilizados para o congelamento de espermatozoides .....	38
Tabela 3 -	Composição química do diluidor Tris-frutose-ácido cítrico contendo 10% de lipoproteínas de baixa densidade .....	41
Tabela 4 -	Delineamento experimental para a marcação das amostras com os fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5, para a análise de eletroforese 2D-DIGE .....	48
Tabela 5 -	Medidas de posição e de dispersão do $\Delta R_{(MT)}$ (declínio da motilidade total entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento) .....	60
Tabela 6 -	Valores de média, erro-padrão, mínimo e máximo do $\Delta R_{(MT)}$ por categoria de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento	60
Tabela 7 -	Valores de média, erro-padrão, mínimo e máximo do declínio médio da motilidade total de espermatozoides de búfalos submetidos ao processo congelamento-descongelamento .....	62
Tabela 8 -	Caracterização numérica de ejaculados e animais dos grupos de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	62
Tabela 9 -	Parâmetros seminais dos ejaculados de búfalos classificados como de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento .....	63
Tabela 10 -	Relação entre volume de sêmen e diluidor para diluição dos ejaculados RB e RR para o congelamento .....	63
Tabela 11 -	Média e erro-padrão da motilidade total (%) dos espermatozoides de búfalos, por momento de avaliação no CASA, nos grupos de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento .....	64
Tabela 12 -	Média e erro-padrão do declínio da motilidade total (%) dos espermatozoides de búfalos entre os tempos de avaliação antes e após o congelamento-descongelamento, em ejaculados RB e RR .....	65
Tabela 13 -	Características espermáticas e seminais, <i>in natura</i> , dos ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	68

Tabela 14 - Média e erro-padrão do declínio da motilidade total (%) dos espermatozoides de búfalo, avaliados no CASA, após o congelamento e o período de incubação pós-descongelamento, em ejaculados RB e RR .....	70
Tabela 15 - <i>Average ratio</i> , peso molecular e ponto isoelétrico dos <i>spots</i> diferencialmente intensos no pool de plasma seminal RBp, destacados na Figura 26A .....	80
Tabela 16 - Dados numéricos e percentuais referentes à seleção, excisão e identificação dos <i>spots</i> diferencialmente intensos no pool de plasma seminal RBp, avaliados por DIGE e selecionados para a espectrometria de massas .....	83
Tabela 17 - Proteínas diferencialmente abundantes no plasma seminal de ejaculados de búfalos de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	84

---

## LISTA DE ANEXOS

---

ANEXO I - Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA – UMFG)	104
---	-----

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ALH= amplitude do deslocamento lateral da cabeça  
BCF= frequência do batimento do flagelo  
BSA= albumina sérica bovina  
CASA= Computer Assisted Sperm Analysis  
 $\Delta R_{(MT)}$ = declínio da motilidade total no processo de congelamento-descongelamento  
DIGE= eletroforese em gel diferencial  
HO= teste hiposmótico  
IEF= focalização isoeétrica  
IPG= gradiente de pH imobilizado  
LDL= lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo  
LIN= linearidade  
 $N_2L$ = nitrogênio líquido  
PAGE= eletroforese em gel de poliacrilamida  
PC= pré-congelamento  
PD\_T5= 5 minutos após o descongelamento  
PD\_T60= 60 minutos após o descongelamento  
PD\_T120= 120 minutos após o descongelamento  
PD\_T180= 180 minutos após o descongelamento  
pI= ponto isoeétrico  
PR= pré-resfriamento  
MW= peso molecular  
RB= grupo de ejaculados de resistência espermática boa  
RI= grupo de ejaculados de resistência espermática intermediária  
RR= grupo de ejaculados de resistência espermática ruim  
SDS= dodecil-sulfato de sódio  
SDS-PAGE= eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio  
STR= retilinearidade  
TRIS= (hidroximetil)aminometano  
VAP= velocidade média da trajetória  
VCL= velocidade curvilínea  
VSL= velocidade linear  
1D= unidimensional  
2D= bidimensional

---

## SUMÁRIO

---

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
3.1.	A ESPÉCIE BUBALINA <i>Bubalus Bubalis</i> .....	21
3.2.	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM ESPERMATOZOIDES CONGELADOS NA ESPÉCIE BUBALINA ( <i>Bubalus bubalis</i> ) .....	22
3.3.	VARIABILIDADE INDIVIDUAL NA RESISTÊNCIA DOS ESPERMATOZOIDES AO CONGELAMENTO .....	23
3.4.	PLASMA SEMINAL .....	24
3.4.1.	Efeitos do plasma seminal sobre a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento .....	26
3.4.2.	Proteínas do plasma seminal e sua função biológica .....	29
3.4.3.	Proteínas do plasma seminal relacionadas à resistência espermática ao congelamento .....	32
3.4.4.	Proteínas do plasma seminal como marcadores de congelabilidade espermática .....	34
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1.	COLETA DE SÊMEN .....	38
4.1.1.	Condições experimentais .....	38
4.1.2.	Animais .....	38
4.1.3.	Coleta do sêmen .....	38
4.2.	AVALIAÇÃO DO SÊMEN <i>IN NATURA</i> .....	39
4.2.1.	Características macroscópicas .....	39
4.2.2.	Características microscópicas .....	39
4.2.2.1.	Turbilhonamento .....	39
4.2.2.2.	Motilidade total e vigor espermático .....	39
4.2.2.3.	Concentração espermática .....	39

4.2.2.4.	Morfologia espermática .....	40
4.2.2.5.	Integridade funcional da membrana plasmática .....	40
4.3	PROCESSAMENTO DO SÊMEN PARA O CONGELAMENTO DE ESPERMATOZOIDES .....	40
4.3.1.	Diluição do sêmen .....	40
4.3.2.	Preparo do diluidor .....	41
4.4.	PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO DE ESPERMATOZOIDES .....	41
4.4.1.	Protocolo de resfriamento .....	42
4.4.2.	Protocolo de congelamento .....	42
4.4.3.	Protocolo de descongelamento .....	42
4.5	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA .....	43
4.6.	ESTUDO DA RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA AO PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO .....	43
4.7.	ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL .....	44
4.7.1.	Obtenção do plasma seminal .....	44
4.7.2.	Seleção dos ejaculados e formação dos grupos experimentais .....	44
4.7.3.	Concentração proteica do plasma seminal .....	45
4.7.4.	SDS-PAGE .....	45
4.7.5.	Avaliação do perfil proteômico individual .....	45
4.7.6.	2D SDS-PAGE .....	46
4.7.7.	Eletroforese diferencial ( <i>Difference in-gel electrophoresis</i> , DIGE) .....	47
4.7.8.	Análise dos géis DIGE .....	48
4.7.9.	Espectrometria de Massas – MALDI-TOF/TOF .....	48
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>



5.1.	VARIAÇÃO INTER E INTRA-INDIVÍDUO NA RESISTÊNCIA DOS ESPERMATOZOIDES DE BÚFALO ( <i>Bubalus bubalis</i> ) AO PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO .....	51
5.1.1.	Variação entre ejaculados de diferentes indivíduos .....	51
5.1.2.	Variação inter-indivíduo .....	52
5.1.3.	Variação intra-indivíduo .....	54
5.2.	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EJACULADOS DE BÚFALO ( <i>Bubalus bubalis</i> ) QUE APRESENTAM MAIOR E MENOR RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA AO PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO .....	59
5.2.1.	Classificação dos ejaculados de acordo com a resistência espermática ao congelamento-descongelamento .....	59
5.2.2.	Caracterização dos grupos de ejaculados classificados como sendo de resistência espermática boa e ruim ao congelamento-descongelamento .....	61
5.2.3.	Características espermáticas e seminais pré-congelamento de ejaculados RB e RR .....	63
5.2.4.	Avaliação da sobrevivência e longevidade espermáticas em ejaculados RB e RR antes e após o processo de congelamento-descongelamento .....	64
5.2.5.	Avaliação da cinética espermática em ejaculados RB e RR antes e após o processo de congelamento-descongelamento .....	66
5.3.	ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL .....	67
5.3.1.	Caracterização dos grupos de ejaculados RB <sub>p</sub> e RR <sub>p</sub> quanto às características do sêmen <i>in natura</i> e à sobrevivência espermática ao congelamento e longevidade após o descongelamento .....	68
5.3.2.	Avaliação da qualidade das amostras de plasma seminal dos ejaculados de resistência espermática boa (RB <sub>p</sub> ) e ruim (RR <sub>p</sub> ), selecionados para análise proteômica .....	70
5.3.3.	Avaliação intra e inter-indivíduo da reprodutibilidade do perfil proteômico do plasma seminal entre ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	71
5.3.4.	Diferenças no perfil proteômico do plasma seminal entre ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento .....	75
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	85
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	90

<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na bubalinocultura, o congelamento de espermatozoides utilizado em associação à inseminação artificial é uma ferramenta importante para potencializar a eficiência produtiva dos rebanhos (Gordon, 2017). Por exigir a diluição do sêmen em meios apropriados e permitir sua manutenção por período prolongado, a técnica de congelamento de espermatozoides possibilita a maximização da produção de doses inseminantes a partir de um único ejaculado, ampliando o uso de machos com características genéticas de interesse (Holt e Penfold, 2014). No entanto, embora avanços tenham sido alcançados quanto à utilização de espermatozoides congelados no manejo reprodutivo de búfalos, ainda há a necessidade de aprimoramento da técnica, no que se diz respeito à qualidade da dose após o descongelamento (Kadirvel et al., 2009; 2012; Kumar et al., 2014; Mughal et al., 2017).

Durante as diferentes etapas do congelamento – diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento – a célula espermática sofre diversas modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, que podem levar ao comprometimento estrutural e funcional de todos os compartimentos celulares (Bailey et al., 2000; Holt, 2000a; Watson, 2000). Assim, como resultado dessas modificações, uma grande proporção de espermatozoides não sobrevive ao processo, resultando em redução significativa da motilidade após o descongelamento. Além disso, parte das células ainda móveis, consideradas de baixa viabilidade, apresentam distúrbios funcionais, cuja intensidade está diretamente relacionada à extensão dos danos provocados nas estruturas celulares, principalmente na membrana plasmática, DNA e mitocôndrias (Parks e Graham, 1992; Bailey et al., 2000; Watson, 2000). Como consequência, essa população espermática apresenta, *in vitro*, baixa longevidade, integridade e estabilidade da membrana plasmática, reduzido potencial mitocondrial, elevada fragmentação do DNA, aumento da capacitação espermática e reação acrossômica prematuras e/ou baixa fertilidade (Holt, 2000a; Rasul et al., 2001; Kumar et al., 2014). Tais características *in vitro* estão associadas à baixa sobrevivência no trato reprodutivo feminino e fertilidade dos espermatozoides após o descongelamento (Watson, 2000).

A extensão dos danos provocados pelo processo de congelamento depende da resistência dos espermatozoides ao criodano que, por sua vez, é influenciada pela combinação de diversos fatores, alguns dos quais relacionados ao protocolo de congelamento, como taxa de resfriamento, meio diluidor e crioprotetor; e outros, relacionados ao doador, como espécie, raça, nutrição e sazonalidade (Loomis e Graham, 2008; Andrabi, 2009; Yeste., 2016). No entanto, independentemente de qualquer desses fatores, tem sido demonstrado que, ainda que de mesma qualidade inicial e submetidos ao mesmo protocolo de criopreservação, os espermatozoides de determinados animais e/ou ejaculados apresentam maior ou menor resistência ao processo de congelamento, resultando em diferenças na qualidade espermática após o descongelamento (Roca et al., 2006; Singh et al., 2013; Magalhães et al., 2016; Rickard et al., 2016).

Essa variação na “congelabilidade espermática” entre indivíduos da mesma espécie, entre ejaculados do mesmo indivíduo e, inclusive, entre frações de um mesmo ejaculado foi descrita em diferentes espécies, como equina (Aurich et al., 1996), bovina (Jobim et al., 2004, Magalhães et al., 2016), canina (Yu et al., 2002), suína (Roca et al., 2006; Hernández et al., 2007a), bubalina (Asadpour et al., 2007; Singh et al., 2014) e ovina (Rickard et al., 2015). Em alguns estudos, as diferenças na qualidade espermática após o descongelamento permitiram a identificação de ejaculados de “boa/alta” e “má/baixa” congelabilidade e/ou animais “bons” e “maus” congeladores (Hernández et al., 2007a; Casas et al., 2010; Jobim et al., 2011; Rickard et al., 2015). Por essas diferenças, a congelabilidade espermática tem sido apontada como uma característica individual, determinada por fatores, ainda não conhecidos, inerentes ao ejaculado e/ou ao animal (Holt, 2000b; Roca et al., 2006; Yeste, 2016).

Nesse contexto, dado a evidências apresentadas em diferentes espécies, o plasma seminal tem sido considerado como um provável fator influenciador da congelabilidade espermática (Aurich et al., 1996; Alkmin et al., 2014; Rickard et al., 2015). Isso se deve, em parte, à participação de seus diversos constituintes (íons, açúcares, lipídeos, enzimas antioxidantes, proteínas) na modulação da função celular, por interação direta ou indireta com o espermatozoide (Juyena e Stelletta, 2012). Somado a isso, tem sido sugerido que diferenças na composição do plasma seminal poderiam explicar a variabilidade na resistência dos espermatozoides ao congelamento, reforçando a possível influência desse fluido nesse processo (Vilagran et al., 2015; Rickard et al., 2016). De fato, foi demonstrado que os efeitos do plasma seminal sobre a congelabilidade espermática variam de acordo com as características do animal e/ou do ejaculado dos quais foi recuperado. Em alguns estudos, a resistência dos espermatozoides ao congelamento foi significativamente alterada pela adição de plasma seminal de animais “bons” ou “maus” congeladores, a partir da qual foram alcançados aumentos ou reduções da qualidade espermática após o descongelamento, respectivamente (Aurich et al., 1996; Hernández et al., 2007a; Rickard, 2015).

Diante disso, especial atenção tem sido dada às proteínas presentes nesse fluido, as quais são consideradas os principais moduladores da função espermática (revisado por Moura e Memili, 2016). Em diferentes espécies, variações na concentração de determinadas proteínas foram associadas às alterações que ocorrem na célula espermática durante o processo congelamento-descongelamento (Barrios et al., 2005; Singh et al., 2014). Não somente efeitos de proteínas isoladas foram descritos, mas diferenças no perfil proteômico do plasma seminal têm sido demonstrados entre ejaculados de boa e má congelabilidade ou animais bons e maus congeladores nas espécies bovina (Jobim et al., 2004), equina (Jobim et al., 2011), suína (Vilagran et al., 2015) e ovina (Rickard et al., 2016).

Enquanto um considerável número de evidências aponta para a influência das proteínas do plasma seminal sobre a congelabilidade espermática, a variabilidade dessa característica ressalta a importância de serem identificados os fatores presentes no ejaculado que conferem maior ou menor proteção à célula espermática contra o criodano. Assim sendo, a identificação das proteínas do plasma seminal associadas à congelabilidade espermática poderia ser uma ferramenta para a adequação de meios diluidores e/ou protocolos de congelamento que resultem em doses inseminantes de maior potencial fertilizante. Isso assume especial importância no contexto atual da bubalinocultura, no qual, em paralelo ao crescimento da atividade, a necessidade de intensificação do melhoramento genético aumenta a demanda por touros com características genéticas de interesse, os quais podem apresentar espermatozoides de baixa resistência ao congelamento e, assim, originar doses inseminantes de reduzido potencial fertilizante após o descongelamento.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as diferenças no perfil proteômico do plasma seminal de búfalos (*Bubalus bubalis*) relacionadas à resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. Para isso, adotou-se como objetivos específicos: (i) estudar a variação inter e intra-indivíduo na sobrevivência espermática ao congelamento e longevidade após o descongelamento; (ii) avaliar as diferenças na motilidade e na cinética espermática entre os ejaculados que apresentam espermatozoides mais ou menos resistentes ao congelamento-descongelamento; (iii) Comparar o perfil proteômico do plasma seminal entre ejaculados classificados como sendo de maior e menor resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento; (iv) Identificar as proteínas do plasma seminal diferencialmente abundantes entre os ejaculados de maior ou menor resistência espermática ao congelamento-descongelamento.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A ESPÉCIE BUBALINA *Bubalus bubalis*

A espécie bubalina *Bubalus bubalis*, também conhecida como búfalo doméstico ou búfalo da água, pertence à classe Mammalia, subclasse Ungulata, ordem Artiodactyla, sub-ordem Ruminantia, família Bovidae, sub-família Bovinae e tribo Bovini, que inclui, dentre outros, os gêneros *Bubalus* (búfalo Asiático) e *Syncerus* (búfalo Africano). Dentre as três espécies de búfalo Asiático, *Bubalus depressicornis*, *Bubalus mindorensis* e *Bubalus arnee*, apenas essa última, também conhecida como búfalo selvagem, foi domesticada, originando a espécie *Bubalus bubalis*, a qual foi distribuída para diferentes regiões do mundo para a produção de leite, carne e couro (Borghese, 2005; Mingala et al., 2017).

Os animais pertencentes à essa espécie ainda podem ser classificados em dois tipos: búfalo do rio e búfalo do pântano, cujas diferenças incluem características genéticas, morfológicas, comportamentais, além de diferirem em sua distribuição e utilização ao redor do mundo. Devido à baixa produção leiteira e excelente capacidade de tração, o búfalo do pântano é mais utilizado como força de tração e para a produção de carne. São encontrados em alguns países da Europa, mas principalmente criados em países da Ásia, em alguns dos quais compõem o rebanho bubalino nacional (Mingala et al., 2017). Por sua vez, o búfalo do rio é o tipo mais difundido em vários países do mundo, principalmente da Ásia, Europa e América do Sul, como raças puras ou cruzadas, sendo a Murrah a mais comum (Borghese, 2005). Os búfalos do tipo rio são considerados de duplo ou triplo propósito por apresentarem, além de boa capacidade de tração e qualidade de carne, elevada produção leiteira, em quantidade e qualidade, pela qual têm apresentado extrema importância econômica em alguns países em desenvolvimento (Faye e Konuspayeva, 2012; Mingala et al., 2017).

De forma geral, o búfalo doméstico apresenta capacidade de adaptação a uma grande variedade de climas, altitudes e temperaturas, suportando com eficiência ambientes pantanosos. Além disso, o búfalo doméstico ainda é reconhecido por melhor se adaptar em regiões de clima tropical, comparativamente aos bovinos, apresentando maior resistência ao estresse térmico e a determinadas doenças, e maior digestibilidade de forragens com elevado teor de fibra bruta, o que confere ao búfalo melhor conversão alimentar quando mantidos em pastagens de pior qualidade (Mingala et al., 2017). Como resultado dessas características, a bubalinocultura tem sido considerada como promissora para a indústria da carne e do leite, pelo seu potencial em combinar boa produtividade e baixos custos de produção, e atender aos padrões emergentes de produção sustentável, o que tem favorecido sua intensificação como atividade agropecuária (Naveena e Kiran, 2014; Wanapat e Chanthakhoun, 2014).

Dados apresentados pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) mostram que a população mundial de búfalos e, conseqüentemente, a produção de carne e leite, estão em constante crescimento, principalmente em países menos desenvolvidos, nos quais a bubalinocultura tem apresentado grande importância econômica (Faye e Konuspayeva, 2012; Wanapat e Chanthakhoun, 2014; FAOSTAT, 2016). Nos últimos dez anos, houve crescimento de aproximadamente 10,0% na população mundial de búfalos, associado a 34,0% e 19,0% de aumento na produção mundial de leite e carne de búfalo, respectivamente (FAOSTAT, 2016). Atualmente, essa espécie compreende aproximadamente 199 milhões de cabeças distribuídas em países da Ásia (97,1% da população mundial de búfalos), África (2,1%), Europa (0,2% - principalmente na Itália), América do Sul (0,7%), e na Austrália, país no qual representam 0,02% do rebanho mundial (FAOSTAT, 2016; Mingala et al., 2017).

No Brasil, a bubalinocultura é uma atividade ainda em crescimento, destinada à produção de leite e carne, principalmente. Acompanhando o panorama mundial, o rebanho nacional apresentou um crescimento de aproximadamente 16,0% entre os anos de 2006 e 2016 (IBGE, 2016). Em 2016, o

rebanho bubalino brasileiro foi estimado em aproximadamente 1,4 milhões de cabeças, distribuídas principalmente nas regiões Norte e Sudeste, as quais possuem 80% do rebanho nacional (IBGE, 2016). É importante ressaltar que as estimativas oficiais apresentadas para o rebanho bubalino nacional possivelmente estão subestimadas, sendo o número de cabeças ainda maior para essa espécie. Segundo Bernardes (2010), devido a particularidades do sistema estatístico oficial brasileiro, por vezes há confusão entre os registros de bovinos e bubalinos e, assim, a dimensão real do rebanho bubalino parece ser subestimada. Naquele ano, enquanto dados oficiais apresentados pelo IBGE estimavam o rebanho bubalino brasileiro como sendo de 1,2 milhões de cabeças, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) estimava, por levantamentos indiretos e avaliações de taxas abate/desfrute, que o mesmo rebanho atingia cerca de 3,5 milhões de cabeças, com um crescimento anual de pelo menos 3,0 a 3,5% ao ano (Bernardes, 2010).

### 3.2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM ESPERMATOZOIDES CONGELADOS NA ESPÉCIE BUBALINA (*Bubalus bubalis*)

Na bubalinocultura, assim como em outras espécies de produção, a inseminação artificial (IA) é considerada a biotécnica reprodutiva mais importante, por contribuir significativamente para a disseminação de material genético de machos superiores e controle de doenças venéreas (Singh e Balhara, 2016). No entanto, a aplicação da IA em búfalos ainda é limitada, em parte, devido às baixas taxas de concepção que têm sido alcançadas pela técnica, as quais variam, em média, de 30% a 60%, de acordo com a abordagem utilizada para o processamento do sêmen – fresco, resfriado ou congelado – e/ou para a inseminação artificial – convencional ou em tempo fixo (Andrabi, 2009; Baruselli et al., 2009; Singh e Balhara, 2016). Isso tem mantido a monta natural como a estratégia reprodutiva predominante na bubalinocultura mundial (Borghese, 2005).

A aplicação da IA na bubalinocultura varia entre os países, dependendo da participação dos criadores e/ou do desenvolvimento de programas governamentais de melhoramento genético, com maior motivação naquelas regiões em que a bubalinocultura apresenta grande relevância econômica. Em países da Europa e leste da Ásia, a utilização da IA é baixa, com um índice máximo de fêmeas inseminadas de 5% na Itália, 3,7% no Azerbaijão, 0,3% no Egito e 0,1% na Romênia. Em outros países, como a Bulgária, a IA é utilizada em grande parte da produção, atingindo um percentual de aproximadamente 80% do rebanho de fêmeas bubalinas inseminadas (Borghese, 2005; Borghese, 2010; Singh e Balhara, 2016).

Alguns fatores envolvidos nas reduzidas taxas de concepção obtidas com a utilização da IA na bubalinocultura são baixa expressão dos sinais de estro pela fêmea bubalina, o que dificulta a predição do momento adequado para a inseminação e baixa disponibilidade de doses inseminantes obtidas de animais testados (Barile, 2005; Ohashi et al., 2006; Gordon, 2017). Além disso, a baixa qualidade das doses inseminantes tem sido um grande entrave para a expansão da aplicação da IA, principalmente quando essas doses são produzidas com espermatozoides congelados (Mughal et al., 2017). De fato, devido à baixa longevidade e viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento, o intervalo inseminação-ovulação se torna ainda mais crítico para as taxas de concepção, comprometendo a eficiência da IA nas fêmeas bubalinas (Watson, 2000; Rasul et al., 2001; Mahmoud et al., 2013). Em geral, quando da utilização de sêmen congelado, têm sido obtidas taxas de concepção de 25% a 45% (Campanile et al., 2011; Gaviraghi et al., 2013; Mahmoud et al., 2013; Lu et al., 2015; Gordon, 2017), sendo que, em condições a campo, relatos de taxas de aproximadamente 20% são encontrados na literatura (Anzar et al., 2003).

Apesar dos baixos índices obtidos a partir da IA com sêmen congelado, a busca pela intensificação do melhoramento genético da espécie, decorrente da expansão da atividade, tem levado a um aumento na produção de doses inseminantes. Na Índia, por exemplo, país no qual a IA em búfalos é incentivada por programas governamentais, entre os anos de 1999-2000 e 2010-2011, o número de doses congeladas

produzidas a partir do sêmen de bovinos e búfalos aumentou de 22 milhões para 63 milhões. Associado a isso, o número de inseminações, considerando-se essas duas espécies, aumentou de 18,8 milhões em 1996-1997 para 50,7 milhões em 2010-2011 (Singh e Balhara, 2016). Atualmente, as centrais de inseminação nesse país estão produzindo aproximadamente 85 milhões de doses, com expectativa de aumento para 140 milhões até 2021-2022 (Singh e Balhara, 2016). No Brasil, não foram encontrados dados científicos e/ou relatos na literatura ou dados oficiais, referentes à espécie bubalina, sobre a produção e utilização de doses inseminantes produzidas com sêmen congelado.

### 3.3. VARIABILIDADE INDIVIDUAL NA RESISTÊNCIA DOS ESPERMATOZOIDES AO CONGELAMENTO

Estudos sobre a criopreservação espermática nas diferentes espécies de animais domésticos têm colocado em evidência a grande variabilidade na resistência espermática ao congelamento existente entre indivíduos, entre ejaculados do mesmo indivíduo e, inclusive, entre diferentes frações do ejaculado nas espécies equina (Aurich et al., 1996; Katila et al., 2002; Loomis e Graham, 2008), suína (Peña et al., 2003; Roca et al., 2006), bovina (Shamsuddin e Larsson, 1993; Jobim et al., 2004; Magalhães et al., 2016), bubalina (Dhami et al., 1996; Shelke e Dhami, 2001; Singh et al., 2014) e ovina (Rickard et al., 2015). Independentemente da qualidade espermática do sêmen *in natura*, diferentes respostas a um mesmo protocolo de congelamento-descongelamento podem ser obtidas dependendo do ejaculado e/ou do animal do qual os espermatozoides foram recuperados. Isso tem sido constantemente observado quando da utilização de protocolos de congelamento de espermatozoides padronizados para uma determinada espécie, os quais podem ser ótimos para alguns animais ou ejaculados, mas subótimos ou ineficientes para outros. Observações práticas nesse sentido também foram relatadas por alguns autores, mostrando que os espermatozoides de determinados doadores de sêmen de centrais de inseminação artificial apresentam maior tolerância ao congelamento apenas após ajustes do protocolo padrão (Holt, 2000b; Thurston et al., 2002a; Loomis e Graham, 2008).

Resultados dessa variação na resistência dos espermatozoides ao congelamento são observados tanto na sobrevivência espermática ao congelamento propriamente dito quanto na longevidade e qualidade dos espermatozoides após o descongelamento (Peña et al., 2003; Roca et al., 2006; Magalhães et al., 2016; Rickard et al., 2015). Na espécie ovina, Rickard et al. (2015) avaliaram a resposta ao congelamento dos espermatozoides obtidos de seis ejaculados de 17 carneiros. Mesmo que submetidos ao mesmo protocolo, foi observada uma grande variação no declínio da motilidade total após o descongelamento (média de seis ejaculados) entre os doadores. Enquanto em média apenas 13,8% dos espermatozoides de um animal não sobreviveram ao congelamento, o percentual médio de redução da motilidade total nos ejaculados de outro carneiro foi de 40,4%. Essa variação também foi observada na longevidade dos espermatozoides quatro horas após o descongelamento, quando a queda média da motilidade total variou de 33,5% a 61,7%, entre os doadores.

Em suínos, variações na resistência espermática ao congelamento foram descritas entre ejaculados do mesmo animal por Roca et al. (2006). Grande variabilidade da motilidade total (média das avaliações em 30 e 150 minutos após o descongelamento) dos espermatozoides descongelados foi observada entre 12 ejaculados coletados de cada varrão ( $n = 15$ ). Enquanto em alguns animais a maior diferença, entre os ejaculados, na motilidade espermática após o descongelamento foi menor que 20%, em outros, intervalos extremos, de 15% a 60%, foram observados. Resultados similares foram obtidos para a viabilidade espermática, que incluiu a integridade da membrana plasmática e do acrossoma, e o potencial mitocondrial.

Diferenças entre frações do mesmo ejaculado também foram descritas por Peña et al. (2003) na espécie suína. Nesse estudo, a motilidade total após o descongelamento dos espermatozoides obtidos de cada uma das frações do ejaculado variou entre os animais ( $n = 5$ ) de 28,5% a 61,1%. No entanto,



quando comparadas as duas frações do ejaculado dentro do animal, diferenças na motilidade total foram observadas em alguns animais, enquanto em outros nenhuma diferença foi observada. Resultado semelhante foi encontrado para a integridade da membrana espermática, no qual em apenas um animal as duas frações do ejaculado diferiram significativamente na porcentagem de células com membrana íntegra. Além disso, grande variação nessa característica foi observada tanto entre a mesma fração obtida de animais diferentes quanto entre as duas frações dentro de cada animal. Esses resultados, além de fornecerem evidências da variabilidade da resistência espermática ao congelamento entre diferentes frações do mesmo ejaculado, reforçam os achados de que a variação da resposta ao congelamento é dependente do animal do qual os espermatozoides foram obtidos.

Ademais à sua influência sobre a sobrevivência e longevidade espermáticas após o descongelamento, o efeito do doador sobre a capacidade fertilizante dos espermatozoides submetidos ao processo de congelamento foi demonstrado tanto *in vitro* como *in vivo*, em estudos nas espécies suína e bovina (Beatty et al., 1976; Larsson e Einarsson, 1976; Shamsuddin e Larsson, 1993). Nesse sentido, em estudo realizado por Beatty et al. (1976), foram utilizados pools de sêmen obtidos de quatro touros para a inseminação artificial heterospermica com sêmen fresco e congelado. A partir da tipagem sanguínea dos bezerros oriundos dessas inseminações, foi observado que a proporção de bezerros gerados por cada touro foi alterada pelo congelamento. Enquanto um touro foi favorecido pelo congelamento, obtendo aumento do número de bezerros gerados, dois outros touros foram desfavorecidos e aquele restante foi pouco afetado pelo processo. Variação semelhante foi observada por Larsson e Einarsson (1976), quando de quatro varrões utilizados como doadores de espermatozoides para a IA com sêmen congelado, um apresentou fertilidade superior, enquanto outro se mostrou infértil, apresentando, *in vitro*, o maior declínio da motilidade espermática no teste de termoresistência. Segundo os autores, em contraste ao resultado obtido após o congelamento de espermatozoides, esse último animal era caracterizado como de elevada fertilidade, quando utilizado como doador para a IA com sêmen resfriado.

Essas diferenças individuais na resistência espermática ao congelamento-descongelamento guiaram a classificação de ejaculados de “boa” e “má congelabilidade” e também de alguns animais como “bons” e “maus congeladores”, de acordo com a qualidade espermática pós-descongelamento (Roca et al., 2006; Rickard et al., 2015). Apesar das diferenças entre os estudos no critério utilizado para essas classificações, a baixa congelabilidade dos espermatozoides é caracterizada pela menor resistência dessas células aos danos causados pelo processo de congelamento-descongelamento. Assim, os ejaculados ditos de má congelabilidade são aqueles cuja população de espermatozoides apresenta, após o descongelamento, reduzida sobrevivência, longevidade e/ou viabilidade, resultando em menor capacidade fertilizante (Gil et al., 2005; Roca et al., 2006). Por sua vez, os animais considerados bons ou maus congeladores geralmente são aqueles que, respectivamente, produzem mais frequentemente ejaculados de boa ou má congelabilidade, ou que, em média, apresentam espermatozoides de maior ou menor qualidade após o descongelamento (Hernández et al., 2007a; Rickard et al., 2015)

Muito embora as causas da variação intra-espécie na congelabilidade espermática não estejam esclarecidas, acredita-se que essa não seja uma característica aleatória, mas influenciada por diferentes fatores como raça, idade, sazonalidade, nutrição e protocolos de congelamento (Dhami et al., 1996; Holt et al., 2005; Yeste, 2016). No entanto, tem sido sugerido que características intrínsecas ao animal são determinantes da congelabilidade espermática, o que explica o fato de alguns doadores constantemente apresentarem espermatozoides mais resistentes ao congelamento em comparação a outros animais, ainda que submetidos às mesmas condições de manejo e de manipulação e processamento do sêmen (Rocca et al., 2006). Em alguns estudos, a resposta dos espermatozoides a alterações no protocolo de congelamento, como mudança nas taxas de resfriamento e descongelamento, e na composição do meio diluidor, foi dependente do doador (Yu et al., 2002; Hernández et al., 2007b; Medrano et al., 2009). De fato, algumas características que irão influenciar a resistência espermática ao congelamento, como a

estrutura e a funcionalidade da membrana plasmática, estão sujeitas a variações individuais (Holt, 2000b; Chaveiro et al., 2006; Hoffman et al., 2011; Singh et al., 2014).

Frente a isso, da mesma forma que para as diferenças entre espécies na criotolerância espermática, alguns autores têm sugerido uma possível influência genética para a variação entre indivíduos na resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento (Roca et al., 2006). Na espécie suína, Thurston et al. (2002b) demonstraram que espermatozoides obtidos de diferentes ejaculados de varrões classificados como bons e maus congeladores apresentaram diferenças em regiões específicas do genoma, as quais foram correlacionadas à variação na congelabilidade espermática. O efeito do animal na resistência dos espermatozoides ao congelamento foi também apresentado no estudo de Roca et al. (2006), no qual 70% da variação entre ejaculados na qualidade espermática pós-descongelamento foi explicada pelo fator animal.

No entanto, tem sido sugerido que as diferenças genéticas não explicam por completo a variação entre indivíduos na resistência espermática ao congelamento, visto que espermatozoides epididimários e ejaculados obtidos do mesmo animal e submetidos ao mesmo protocolo de congelamento apresentam diferenças na sobrevivência e longevidade após o descongelamento (Alkmin et al., 2014). Além disso, outras evidências, como as variações entre ejaculados (Magalhães et al., 2016) e entre frações do ejaculado (Peña et al., 2003) na congelabilidade espermática e o fato de ejaculados de baixa congelabilidade serem mais afetados por alterações no protocolo de congelamento (Hernández et al., 2007b), sugerem que a suscetibilidade dos espermatozoides ao criodano é também influenciada por fatores inerentes ao sêmen. Dessa forma, nas últimas décadas, a variação na congelabilidade espermática também tem sido associada às diferenças na composição do ejaculado, no que se refere às características relacionadas à população espermática ou ao plasma seminal (Hoffman et al., 2011; Jobim et al., 2011; Singh et al., 2014; Rickard et al., 2015).

### 3.4. PLASMA SEMINAL

O sêmen é um fluido constituído por componentes celulares como espermatozoides, células de revestimento do trato reprodutivo, células espermatogênicas, leucócitos e vesículas celulares (epididimossomas e prostassomas); e componentes acelulares, representados por diversas biomoléculas secretadas pelo trato reprodutivo, incluindo a água. Tal fração acelular, denominada plasma seminal, forma o meio líquido que suspende os espermatozoides na ejaculação (Mann, 1964; Sullivan e Saez, 2013; Setchell, 2014).

O plasma seminal é o produto da secreção de um complexo de órgãos formados pelos epidídimos, glândulas sexuais acessórias (ampolas dos ductos deferentes, glândulas vesiculares, próstata e glândulas bulbouretrais), e em relativa pequena proporção pelos testículos (Mann, 1964; Rodríguez-Martínez et al., 2011). Como meio extracelular, o plasma seminal é composto por diversos constituintes, essenciais para a manutenção da estrutura, metabolismo e funcionalidade da célula espermática. Esses componentes podem ser divididos em proteínas, íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{PHO}_4^-$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ ), substratos energéticos (frutose, sorbitol, glicose, inositol), lipídeos (colesterol, fosfolipídeos, diglicerídeos, triglicerídeos), antioxidantes, enzimas, compostos orgânicos (ácido cítrico, aminoácidos, peptídeos), hormônios (estrógeno, progesterona, testosterona, hormônio luteinizante, prolactinas, prostaglandinas, hormônio anti-mülleriano, IGF-1) e citocinas (interleucinas, fator de necrose tumoral) (Mann, 1964; Rodríguez-Martínez et al., 2011; Juyena e Stelletta, 2012).

A secreção do plasma seminal é muito variável entre espécies, dependendo das diferenças anatômicas, particularidades na contribuição das glândulas sexuais acessórias existentes, tipo de ejaculação, diferenças morfofuncionais do sitio de deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea, além da duração da cópula nas diferentes espécies (Mann, 1964; Maxwell et al., 2007; Druart et al., 2013;

Setchell, 2014). Em algumas espécies como canina, equina e suína, nas quais o ejaculado pode ser dividido em diferentes frações durante a ejaculação, tanto o volume quanto a composição do plasma seminal variam entre as frações do ejaculado (Setchell, 2014). Além disso, o volume e a composição bioquímica daquele fluido podem ser influenciados por condições que alteram a função secretória das glândulas sexuais acessórias, como *status* fisiológico e patológico do animal, ou variações ambientais, como a sazonalidade. Assim, há grande variação na secreção do plasma seminal entre indivíduos da mesma espécie e entre ejaculados de um mesmo indivíduo (Mann, 1964; Muiño-Blanco et al., 2008).

A importância do plasma seminal tem sido extensivamente estudada, principalmente no que se refere à participação dos seus diversos constituintes nos eventos que ocorrem ao longo do processo ejaculação-fertilização do oócito. Muito embora o plasma seminal seja, atualmente, considerado fundamental ao longo desse processo, inicialmente, esse fluido era considerado um filtrado do sangue, rico em nutrientes, que fornecia aos espermatozoides um meio para facilitar o transporte dessas células do trato reprodutivo masculino ao feminino (Maxwell et al., 2007). Diversas outras funções do plasma seminal passaram gradativamente a ser reconhecidas, sendo essas de inibição ou estimulação da função espermática e/ou da fertilidade, dependendo do momento do processo ejaculação-fertilização e das condições de manipulação do sêmen (Rodríguez-Martínez et al., 2011; Juyena e Stelletta, 2012; Leahy e de Graaf, 2012).

Acredita-se que, logo na ejaculação, o plasma seminal forneça um ambiente adequado aos espermatozoides, permitindo a existência de diversas outras funções, que vão variar de acordo com a espécie ((Maxwell et al., 2007; Rodríguez-Martínez et al., 2011; Juyena e Stelletta, 2012). Além do importante papel no transporte dos espermatozoides, que propicia o contato dessas células com o trato reprodutivo feminino, o plasma seminal é também importante em vários aspectos da fisiologia reprodutiva. Sua relação com funções essenciais como movimento dos espermatozoides (Maxwell et al., 2007), capacitação espermática (Manjunath e Thérien, 2002), armazenamento e sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino (Gwathmey et al., 2003; Gwathmey et al., 2006) e capacidade fertilizante do espermatozoide (Rath et al., 1989) têm sido demonstradas. Adicionalmente, algumas funções descritas na literatura direcionam-se ao trato reprodutivo feminino, influenciando indiretamente o espermatozoide, como a modulação do sistema imune uterino para tolerar a célula espermática e o embrião, facilitando assim a implantação e o desenvolvimento embrionário (revisado por Robertson, 2005). Além das funções fisiológicas apresentadas, estudos têm mostrado efeitos desse fluido no processo de criopreservação espermática, em diferentes espécies, incluindo proteção contra o choque térmico, redução do estresse oxidativo e da criocapacitação (Hernández et al., 2007a; Muiño-Blanco et al., 2008).

#### 3.4.1. Efeitos do plasma seminal sobre a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento

Está bem estabelecido que o plasma seminal é importante para a função espermática durante os eventos que ocorrem entre a ejaculação e a fertilização (Maxwell et al., 2007). A interação coordenada entre seus constituintes com o espermatozoide mantém um equilíbrio natural de estimulação e inibição da função espermática, sincronizando os eventos celulares necessários à fertilização com o momento da interação espermatozoide-oócito (Maxwell et al., 2007; Juyena e Stelletta, 2012; Bedford, 2015). Entretanto, durante o processo de congelamento-descongelamento de espermatozoides, as alterações celulares causadas pela criopreservação e manipulação *in vitro* provocam o desbalanço entre a estimulação e inibição da função espermática, reduzindo a sobrevivência, longevidade e capacidade fertilizante do espermatozoide (Watson, 2000; Leahy e de Graaf, 2012).

Atualmente, é reconhecido que a tolerância espermática ao processo de congelamento-descongelamento pode ser influenciada pelo plasma seminal, sendo a natureza dessa influência dependente da espécie

(Kareskoski e Katila, 2008; Leahy e de Graaf, 2012). Nesse sentido, foi demonstrado, em ovinos, que a suplementação de plasma seminal após o descongelamento é capaz de alterar, positiva ou negativamente, a qualidade e a longevidade espermática *in vitro* (Ledesma et al., 2016, Ledesma et al., 2017). Em ovinos, doses inseminantes foram descongeladas a 37 °C e os espermatozoides incubados com plasma seminal coletado de doadores de sêmen distintos daqueles utilizados para a produção das doses (plasma seminal heterólogo). A incubação por 60 minutos dos espermatozoides descongelados com plasma seminal levou ao aumento das motilidades total e progressiva, da integridade e estabilidade da membrana espermática, e do potencial mitocondrial (Ledesma et al., 2016, Ledesma et al., 2017).

Garcia et al. (2010) demonstraram que em espermatozoides suínos, a adição de plasma seminal ao meio de descongelamento pode levar ao aumento da longevidade espermática, *in vitro*. Tal aumento mostrou-se dose dependente uma vez que, quando plasma seminal autólogo foi adicionado ao meio de descongelamento, na proporção 1:1, foram observados aumentos da motilidade total e integridade da membrana plasmática em até quatro horas de incubação a 37 °C. O mesmo efeito não ocorreu quando foram adicionados 10% de plasma seminal. Além disso, *in vivo*, observou-se uma associação entre maior qualidade e longevidade espermáticas e a maior fertilidade após a inseminação artificial, quando matrizes inseminadas com espermatozoides descongelados suplementados com meio extensor contendo 50% de plasma seminal autólogo apresentaram maior tamanho de leitegada em relação à dose sem suplementação. Por outro lado, em jumentos, a adição de plasma seminal heterólogo, obtido de animais de fertilidade comprovada, após o descongelamento levou à redução da motilidade total e integridade da membrana plasmática, ao longo de quatro horas de incubação. Esses efeitos também se mostraram ser dose-dependente à medida em que as maiores concentrações de plasma seminal levaram à maior redução da motilidade total e integridade da membrana plasmática (Sabatini et al., 2014).

Efeitos da adição do plasma seminal após o descongelamento sobre a capacitação espermática também foram descritos nas espécies suína (Vadnais et al., 2005), equina (Andrade et al., 2012) e ovina (Ledesma et al., 2016). Nesses estudos, a incubação dos espermatozoides descongelados com plasma seminal homólogo ou heterólogo levou à redução da capacitação espermática, caracterizada pela porcentagem de espermatozoides capacitados e/ou que sofreram reação acrossômica, e pelas alterações celulares características do processo de capacitação, como fosforilação da tirosina e estabilidade da membrana plasmática. De acordo com Vadnais et al. (2005), os efeitos de decapacitação do plasma seminal iniciaram após 15 minutos de incubação a 39 °C, atingindo o máximo aos 30 minutos.

Alguns estudos também têm mostrado uma grande variação dos efeitos do plasma seminal na criotolerância do espermatozoide entre indivíduos da mesma espécie. Nesses estudos, foi demonstrado que a adição de plasma seminal ao meio diluidor de congelamento pode influenciar positivamente, negativamente ou mesmo não influenciar a qualidade espermática após o descongelamento (Garner et al., 2001; Hernández et al., 2007a; Sabatini et al., 2014; Rickard et al., 2015). Na espécie equina, por exemplo, Katila et al. (2002) demonstraram que a adição de plasma seminal autólogo ao meio de congelamento de espermatozoides (50% plasma seminal/50% diluidor) levou ao aumento das motilidades total e progressiva e da porcentagem de células rápidas após o descongelamento. Muito embora as mesmas condições experimentais tenham sido empregadas, esses efeitos foram observados em dois dos três reprodutores utilizados, enquanto no terceiro, nenhum efeito foi observado.

Nesse sentido, tem sido sugerido que os efeitos da adição do plasma seminal sobre a susceptibilidade do espermatozoide ao congelamento-descongelamento são dependentes da origem desse fluido, variando de acordo com as características do animal e/ou do ejaculado dos quais o plasma seminal foi recuperado, o que influenciaria a sua composição. Essa hipótese é fundamentada na conhecida variação da composição do plasma seminal inter e intra-espécie e, inclusive, intra-indivíduo, ou seja, entre ejaculados (Juyena e Stelletta, 2012; Druart et al., 2013; Rickard et al., 2016). De fato, variações nos constituintes do plasma seminal são capazes de influenciar propriedades da célula espermática, como a

estabilidade da membrana plasmática, que são diretamente afetadas durante o congelamento, alterando a susceptibilidade do espermatozoide ao criodano (Manjunath e Thérien, 2002; Singh et al., 2013).

A influência da origem do plasma seminal sobre seus efeitos na resistência do espermatozoide ao congelamento foi demonstrada em alguns estudos, nos quais a variação na congelabilidade espermática foi representada por animais classificados como “bons e maus congeladores”. Na espécie suína, Hernández et al. (2007a) demonstraram que a adição de plasma seminal ao meio diluidor aumentou a sobrevivência espermática (motilidade total, integridade de membrana e acrossoma) ao processo de congelamento. No entanto, esse efeito somente foi observado quando o plasma seminal adicionado ao meio diluidor de congelamento foi obtido de machos considerados bons congeladores (> 60% de motilidade total e espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntegros pós-descongelamento). Nenhum efeito foi observado quando o plasma seminal foi obtido de maus congeladores ou de animais de congelabilidade intermediária.

Por sua vez, Aurich et al. (1996) demonstraram que a adição de plasma seminal de garanhões que apresentam melhor congelabilidade espermática ( $\geq 30\%$  de motilidade progressiva pós-descongelamento) ao diluidor utilizado para o congelamento de espermatozoides de machos de pior congelabilidade ( $\leq 20\%$ ), levou ao aumento tanto da motilidade progressiva quanto da integridade da membrana plasmática após o descongelamento. Também foi observada a redução da motilidade progressiva pós-descongelamento quando os espermatozoides dos machos de melhor congelabilidade foram congelados com o plasma seminal daqueles de pior congelabilidade. Por outro lado, nenhum efeito sobre a congelabilidade espermática foi observado quando o plasma seminal do próprio animal foi adicionado ao meio diluidor.

Em um estudo recente, espermatozoides e plasma seminal de carneiros classificados como de alta ( $n = 3$ ) e baixa ( $n = 3$ ) resistência ao congelamento foram recuperados separadamente. Os congelamentos dos espermatozoides foram realizados de forma que houvesse a combinação entre os espermatozoides e o plasma seminal dentro e entre as categorias. Assim, os espermatozoides de carneiros de alta e baixa resistência ao congelamento foram congelados na presença do plasma seminal obtido dos mesmos animais de alta (HSP) e baixa (LSP) resistência ao congelamento. A importância da origem do plasma seminal foi demonstrada quando a adição de plasma seminal LSP aos espermatozoides de carneiros de alta resistência reduziu a sobrevivência e a longevidade dos mesmos após descongelamento (motilidade total de 0 a 4 horas pós-descongelamento). Por outro lado, a adição de HSP aos espermatozoides de carneiros de baixa resistência provocou um aumento da sobrevivência desses ao congelamento (motilidade total no tempo 0h), mas não foi capaz de alterar a longevidade dos espermatozoides, visto que não houve diferença na motilidade total em 2 e 4 horas após o descongelamento entre os espermatozoides de baixa resistência congelados com HSP e LSP. Segundo os autores, a exposição prévia dos espermatozoides ao plasma seminal LSP durante a ejaculação seria suficiente para que houvesse a interação entre componentes do plasma seminal e o espermatozoide, como a ligação de determinadas proteínas à membrana espermática, sendo essa interação importante para a maior susceptibilidade do espermatozoide ao criodano (Rickard et al., 2015).

Os resultados desses estudos mostram a influência do plasma seminal sobre a sobrevivência espermática ao processo de congelamento e sua longevidade após o descongelamento, mas também apontam para a existência de uma variação nesses efeitos, de acordo com a espécie e com o animal do qual esse fluido foi recuperado. Apesar de ainda não se saber por completo quais os fatores envolvidos nesse processo, alguns autores têm sugerido que esses efeitos são determinados pela composição do plasma seminal que, por sua vez, é influenciada por características intrínsecas ao animal (Rodríguez-Martínez, 2011). Por sua grande influência na função espermática, as proteínas do plasma seminal têm sido consideradas como os principais componentes envolvidos nesse processo (Singh et al., 2014; Rickard et al., 2016). No entanto, também são desconhecidos os mecanismos envolvidos na interação desses constituintes com a célula espermática durante as etapas do congelamento.

### 3.4.2. Proteínas do plasma seminal e sua função biológica

Ao longo das últimas décadas, as pesquisas têm avançando no intuito de melhor entender a relação entre determinados constituintes do plasma seminal e algumas características do espermatozoide no sêmen *in natura* e preservado. Dentre esses componentes, as proteínas foram e têm sido alvo de inúmeros estudos, gerando grandes avanços no conhecimento de suas interações com a célula espermática e participação no processo de fertilização.

As proteínas são os principais constituintes do plasma seminal (em peso), apresentando papel essencial na modulação da função espermática (revisado por Moura e Memili, 2016). Algumas proteínas presentes no plasma seminal foram implicadas em mecanismos relacionados à motilidade espermática (Vinson et al., 1996), capacitação (Manjunath e Thérien, 2002), reação acrossômica (Pietrobon et al., 2005), formação da reserva espermática no trato reprodutivo feminino (Gwathmey et al., 2003; Gwathmey et al., 2006), interação espermatozoide-oócito e fertilidade *in vitro* e *in vivo*; além de outros eventos que ocorrem desde a maturação espermática no epidídimo até o momento da fertilização (Kirchhoff et al. 1998; Jonáková et al., 2000; Moura e Memili, 2016). Apesar de existirem inúmeras semelhanças, a composição proteica do plasma seminal, tanto no que se refere ao tipo de proteína quanto à concentração, é muito variável entre espécies (Rodríguez-Martínez et al., 2011; Druart et al., 2013).

Dentre as proteínas do plasma seminal descritas nas espécies de animais domésticos, as proteínas da família das BSPs (Binder of sperm proteins) estão entre as mais estudadas, apresentando diferentes funções na modulação da função espermática. Essas proteínas foram inicialmente descritas em bovinos, sendo denominadas Bovine Seminal Plasma Proteins (Manjunath et al., 1994). A partir de então, proteínas homólogas foram identificadas no plasma seminal de outras espécies de mamíferos como suína (Calvete et al., 1997), caprina (Villemure et al., 2003), ovina (Bergeron et al., 2005), equina (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005), humana (Kumar et al., 2008) e bubalina (Harshan et al., 2009). Com o objetivo de incorporar as proteínas BSPs de todas as espécies de animais em uma mesma família, as BSPs passaram a ser consideradas uma superfamília, denominada binder of sperm proteins, devido à sua propriedade de ligação à superfície do espermatozoide (Manjunath et al., 2009).

Em bovinos, as BSPs são secretadas pelas glândulas vesiculares e correspondem à maior fração de proteínas do plasma seminal, representando aproximadamente 60% do total de proteínas existentes nesse fluido (Nauc e Manjunath, 2000). Essa família compreende as proteínas BSP-A<sub>1</sub>, BSP-A<sub>2</sub>, BSP-A<sub>3</sub> e a proteína BSP-30 kDa (Manjunath e Sairam, 1987), atualmente denominadas BSP1 (BSP-A<sub>1</sub> e BSP-A<sub>2</sub>), BSP3 e BSP5, respectivamente (Manjunath et al. 2009). Caracterizam-se como proteínas ácidas, de ponto isoelétrico variando de 3,6 a 5,2 e baixo peso molecular - BSP1 (BSPA<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>) e BSP3 (BSP-A<sub>3</sub>) de 15 a 16 kDa, e BSP5 (BSP-30-kDa), de 28 a 30 kDa (Manjunath e Sairam, 1987; Calvete et al., 1996). Apresentam um domínio N-terminal mais longo e um domínio C-terminal mais curto, entre os quais se encontram dois domínios de fibronectina tipo II (FN<sub>2</sub>) (de aproximadamente 40 aminoácidos cada), separados entre si por uma sequência de aminoácidos (Manjunath e Sairam, 1987). As proteínas BSP-A<sub>1</sub> e BSP-A<sub>2</sub> são as mais abundantes no plasma seminal, sendo ambas glicosiladas, com composição idêntica de aminoácidos, diferindo apenas na quantidade de carboidratos (Esch et al., 1983; Manjunath e Sairam, 1987). Por sua vez, a proteína BSP-A<sub>3</sub>, atualmente denominada BSP3 (Manjunath et al., 2009), difere das duas anteriores em sua composição de aminoácidos, além de não ser glicosilada (Manjunath e Sairam, 1987).

As proteínas da família das BSPs são caracterizadas por apresentarem domínios de fibronectina tipo 2 (Fn-2), contendo sítios de ligação de glicosaminoglicanos, fosfolípidos de colina (Desnoyers e Manjunath, 1992), lipoproteínas de alta densidade (Manjunath e Thérien, 2002), gelatina (Manjunath e Sairam, 1987), e antígenos da superfície do espermatozoide (Manjunath et al., 1994). Por essa propriedade, as BSPs são capazes de se ligar à uma grande variedade de moléculas, o que permite sua

participação em diversas funções biológicas desde a ejaculação até a fertilização, por meio da interação tanto com o trato reprodutivo quanto com a membrana do espermatozoide (Gwathmey et al., 2003; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005; Gwathmey et al., 2006).

Na ejaculação, as BSPs se ligam a fosfolípidos de colina da membrana plasmática dos espermatozoides, especificamente fosfatidilcolina e esfingomielina (Desnoyer e Manjunath, 1992; Manjunath et al., 1994; Manjunath e Thérien, 2002), permanecendo ligadas até o início da capacitação espermática, quando as interações entre essas proteínas e os fosfolípidos se perdem (Gwathmey et al., 2006). Um importante resultado dessa associação é a inserção parcial da proteína na camada externa da bicamada lipídica (Muller et al., 1998; Greube et al., 2001), o que restringe a mobilidade dos fosfolípidos, fornecendo estabilidade à membrana durante o trânsito do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea.

Após serem depositados no trato reprodutivo feminino, os espermatozoides são armazenados no segmento inicial da tuba uterina, pela sua ligação ao epitélio (Smith e Yanagimachi, 1991; Lefebvre et al., 1995). Tal processo tem grande importância por permitir a manutenção da fertilidade dos espermatozoides até que ocorra a ovulação (Dobrinski et al., 1996). Nesse contexto, foi demonstrado que as proteínas BSPs (BSP1, BSP3, BSP5) aumentam a ligação dos espermatozoides epididimários ao epitélio da tuba uterina *in vitro* (Gwathmey et al., 2003; Gwathmey et al., 2006). Essa função se deve à propriedade das BSPs de ligação à região da membrana espermática que recobre o acrossoma, região essa responsável pela interação entre as células espermáticas e o epitélio da tuba uterina (Gwathmey et al., 2003). Além disso, foi observado que as BSPs prolongam a manutenção da motilidade durante o armazenamento espermático naquele local (Gwathmey et al., 2006).

Dessa forma, durante o processo *in vivo*, os espermatozoides seriam mantidos na reserva espermática até que se iniciasse o processo de capacitação espermática (Gwathmey et al., 2006). Esse processo seria desencadeado pelo aumento, na tuba uterina, de glicosaminoglicanos semelhantes à heparina, além de lipoproteínas de alta densidade, originados dos fluidos folicular e da tuba uterina (Manjunath e Thérien, 2002). A ligação desses fatores capacitantes às BSPs, aderidas à superfície do espermatozoide, promoveriam o efluxo de fosfolípidos e colesterol da membrana plasmática do espermatozoide, iniciando assim a capacitação espermática (Thérien et al., 1998; 1999). Durante esse processo, a ligação entre os espermatozoides e as BSPs seria desfeita (Gwathmey et al., 2003) e, assim, o espermatozoide capacitado perderia afinidade ao epitélio da tuba uterina, sendo então liberado da reserva espermática (Lefebvre e Suarez, 1996).

Embora as proteínas BSPs pareçam ser muito conservadas entre as diversas espécies de mamíferos (Fan et al., 2006), apresentando provável papel essencial na reprodução (revisado por Moura e Memili, 2016), suas propriedades bioquímicas e suas funções em outras espécies, além da bovina, não estão bem definidas. Dessa forma, embora alguns estudos demonstrem ou sugiram o envolvimento das proteínas BSPs nos eventos que ocorrem ao longo do processo ejaculação-fertilização do oócito, os mecanismos de ação dessas proteínas em outras espécies, são geralmente especulados a partir dos estudos referentes às BSPs na espécie bovina.

Proteínas essencialmente semelhantes às BSPs de bovinos foram descritas no plasma seminal de ovinos e caprinos, sendo denominadas RSVP (RSVP-15 kDa, RSVP-16 kDa, RSVP-22 kDa e RSVP-24 kDa) e GSP (GSP-14, GSP-15, GSP-20 e GSP-22 kDa), respectivamente (Villemure et al., 2003; Bergeron et al., 2005). Em ambas as espécies, essas proteínas representam 20% do total de proteínas presentes no plasma seminal (Villemure et al., 2003; Bergeron et al., 2005). Estudos em ovinos sugerem que as proteínas RSP14 e RSP20 participam da estabilização da membrana espermática e dos processos de capacitação e de reação acrossômica, estando possivelmente envolvidas na interação espermatozoide-oócito no trato reprodutivo feminino (Barrios et al., 2000; 2005). Barrios et al. (2005) demonstraram que essas proteínas se ligam a vários sítios distribuídos na superfície do espermatozoide, sendo liberadas

ou redistribuídas para as regiões equatorial e acrossomal durante a capacitação espermática e reação acrossômica.

Em búfalos, proteínas ligadoras de gelatina e heparina de peso molecular variando entre 12 a 127 kDa foram descritas no plasma seminal e mostraram estar relacionadas à integridade da membrana espermática e à fertilidade *in vitro*. Estudos *in vitro* mostraram que, após a incubação de espermatozoides epididimários com essas proteínas, foi observado um aumento da motilidade progressiva, da viabilidade (coloração eosina-nigrosina), da integridade da membrana plasmática (teste hiposmótico) e da taxa de penetração muco cervical (Arangasamy et al., 2005; Kumar et al., 2008).

Outro grupo de proteínas bem descrito na literatura compreende as espermedesinas, proteínas multifuncionais de peso molecular variando de 12 a 16 kDa, secretadas principalmente pelas glândulas vesiculares (Töpfer-Petersen et al., 1998). São caracterizadas por apresentarem afinidade por diversos oligossacarídeos, polissacarídeos sulfatados, inibidores de serino proteases, glicosaminoglicanos e fosfolípidos e, por isso, assim como as BSPs, são capazes de se ligar à membrana espermática na ejaculação, tendo sido associadas a diversas funções, como modulação da resposta imune, estabilização da membrana plasmática, capacitação espermática, formação da reserva espermática na tuba uterina e interação espermatozoide-oócito (Töpfer-Petersen et al., 1998; 2005). As espermedesinas foram descritas no plasma seminal de bovinos, ovinos, suínos e equinos, sendo as proteínas predominantes no plasma seminal de suínos, ovinos e equinos (Töpfer-Petersen et al., 1998; Bergeron et al., 2005).

Em bovinos, as aSFP (acidic seminal fluid proteins), proteínas que possuem similaridades com a família das espermedesinas, são secretadas pelos epidídimos e pelas glândulas sexuais acessórias (Moura et al., 2007; Moura et al., 2010). Assim como as outras proteínas da família das espermedesinas, a aSFP se liga à superfície do espermatozoide na ejaculação, entretanto, essa ligação é desfeita após a capacitação espermática (Dostàlovà et al., 1994), sugerindo que, em bovinos, essas proteínas não participam da interação espermatozoide-oócito (Moura e Memili, 2016). Além dessas funções, foi descrito que as sSFP regulam a atividade metabólica do espermatozoide, preservando a viabilidade celular (Schoneck et al., 1996).

As espermedesinas são as proteínas mais estudadas no plasma seminal de suínos (Rodríguez-Martínez et al., 2011), representando aproximadamente 75-90% do conteúdo de proteínas do plasma seminal (Töpfer-Petersen et al., 1998). A família das espermedesinas é composta por três proteínas: alanina-glutamina-asparagina (AQN-1 e AQN-3), alanina-triptofano-asparagina (AWNs) e as PSPs I e II (porcine seminal plasma proteins), que apresentam diferentes atividades biológicas, dependendo do grau de glicosilação e de sua habilidade de se ligar à heparina. Enquanto as proteínas AQN-1, AQN-3 e AWN são espermedesinas ligadoras de heparina, as PSPs, que representam 50% do total de proteínas do plasma seminal de suínos, são caracterizadas por não se ligarem à heparina (Caballero et al., 2008; Rodríguez-Martínez et al., 2011).

A ação dessas proteínas se deve à sua capacidade de ligação à membrana plasmática do espermatozoide, a partir da qual participam da estabilização da membrana espermática logo após a ejaculação e, posteriormente, do processo de capacitação, da interação do espermatozoide com o epitélio da tuba uterina ou com a zona pelúcida e da imunoestimulação do sistema reprodutivo da fêmea suína (Rodríguez-Martínez et al., 1998; Töpfer-Petersen et al., 1998; Rodríguez-Martínez et al., 2010). A proteína AQN-3 é a proteína de ligação à zona pelúcida mais predominante (van Gestel et al., 2007). Por outro lado, as proteínas PSP-I/PSP-II são importantes inibidoras da capacitação espermática e da excitose acrossomal prematuras (Caballero et al., 2009), além de apresentarem efeito pró-inflamatório, que modula a resposta imune no trato reprodutivo feminino (Assreuy et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que após a diluição do sêmen fresco, as proteínas PSP-I e PSP-II protegem os espermatozoides, reduzindo a perda da motilidade e viabilidade, e mantendo a capacidade fertilizante



(Caballero et al., 2004). Em espermatozoides de suínos submetidos à elevada diluição ( $1 \times 10^6$  spz/ml), a proteína PSP-I/PSP-II, mas principalmente a PSP-II, exerceram efeito protetor sobre a célula espermática *in vitro*, aumentando a longevidade, viabilidade e atividade mitocondrial até 5 horas pós-diluição (Garcia et al., 2006).

Em ovinos, as espermadesinas representam cerca de 45% das proteínas do plasma seminal (Bergeron et al., 2005). A espermadesina de 15,5 kDa, descrita por Bergeron et al. (2005), apresenta 70% de homologia à AQN-1 presente no plasma seminal de suínos (Töpfer-Petersen et al., 1998) e, assim, foi sugerido que apresentem funções similares de decapacitação logo após a ejaculação, e, posteriormente, de capacitação e ligação do espermatozoide ao epitélio da tuba uterina (Maxwell et al., 2007).

Algumas proteínas do plasma seminal também têm sido associadas à fertilidade do espermatozoide, em bovinos, como a clusterina, a osteopontina (OPN) e a fosfolipase A2 (Ibrahim et al., 2000; Moura e Memili 2016), que também está relacionada à reação acrossômica e a fusão espermatozoide-oócito (Soubeyrand et al., 1997; Pietrobon et al., 2005). Alguns autores têm sugerido que o papel da OPN na fertilização se deve às suas funções bem definidas na migração e adesão de vários tipos celulares, além da quimiotaxia e ativação de macrófagos; e nas evidências de estudos em bovinos, suínos e camundongo, que mostram sua participação na fertilização e em eventos pós-fertilização (revisado por Moura e Memili, 2016). Dessa forma, sugeriu-se que a OPN secretada pelas glândulas sexuais acessórias se ligam ao espermatozoide durante a ejaculação por meio de integrinas, e o complexo integrina-OPN formado interage com a zona pelúcida do oócito (D'Cruz, 1996). De acordo com o modelo proposto por Moura e Memili (2016), o espermatozoide pode interagir com a zona pelúcida tanto diretamente por meio do complexo espermatozoide-integrina-OPN como também esse complexo pode interagir com a OPN ligada à zona pelúcida. No momento em que o espermatozoide entra no espaço perivitelino, a OPN ligada ao segmento pós-equatorial do espermatozoide medeia a interação da célula espermática com o oolema do oócito, por meio das proteínas integrinas (D'Cruz, 1996) e/ou das glicoproteínas transmembranas CD44 (Bains et al., 2002). Essa interação poderá desencadear mecanismos de sinalização celular e influenciar a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Na espécie canina, a OPN está presente em concentrações elevadas no plasma seminal, em diferentes isoformas, mas sua função ainda não está bem definida, sendo sugerido papel similar ao proposto para bovinos (Souza et al., 2009).

Outras proteínas e peptídeos encontrados no plasma seminal como adenosina, angiotensina II, calcitonina e peptídeo promotor da fertilização (FPP) são considerados indutores da capacitação espermática (Fraser et al., 2006). Proteínas como a calcitonina (Mungan et al., 2001), proteínas da família das calicreínas e a enzima conversora de angiotensina (revisado por Moura e Memili, 2016) foram associadas à motilidade espermática. Adicionalmente, algumas proteínas do plasma seminal apresentaram atividade protetora como a albumina, que se liga a peróxidos lipídicos, protegendo o espermatozoide contra o estresse oxidativo (Alvarez e Storey, 1983); e a clusterina, que além de atuar como chaperona (Humphreys et al., 1999), inibe a destruição do espermatozoide no trato reprodutivo feminino (Ibrahim et al., 1999).

### 3.4.3. Proteínas do plasma seminal relacionadas à resistência espermática ao congelamento

A resistência da célula espermática ao congelamento, frequentemente referida como congelabilidade espermática, tem sido associada, em diferentes espécies, às proteínas do plasma seminal. Os resultados apresentados por esses estudos por vezes reafirmam o papel de proteínas anteriormente descritas na modulação de mecanismos celulares do espermatozoide, mas também sugerem a participação dessas proteínas, na proteção do espermatozoide contra os danos celulares provocados pelo processo de congelamento-descongelamento.

Recentemente, Singh et al. (2013) demonstraram a associação de proteínas ligadoras de heparina (HBPs), presentes no plasma seminal de búfalos (Murrah), à susceptibilidade espermática ao criodano. Nesse estudo, os ejaculados foram classificados de acordo com a motilidade progressiva pós-descongelamento como congeláveis (> 40%) ou não congeláveis (< 40%). Embora ambos os grupos tenham se apresentado similares quanto à qualidade espermática no sêmen fresco, os ejaculados não congeláveis foram caracterizados, após o descongelamento, por menor motilidade progressiva, viabilidade espermática e porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro, sugerindo uma maior susceptibilidade dos espermatozoides aos efeitos deletérios causados pelo congelamento. Esses achados foram associados à criocapacitação, visto que os ejaculados não congeláveis apresentaram maior concentração de proteínas HBPs no plasma seminal e, após o descongelamento, menor conteúdo de colesterol nos espermatozoides. Nesse sentido, foi sugerido que as HBPs estariam estimulando o efluxo de colesterol e fosfolípídeos da membrana espermática, promovendo a desestabilização e aumento da fluidez da membrana, o que resultaria na criocapacitação. Posteriormente, Singh et al. (2014) demonstraram que a menor qualidade espermática (motilidade progressiva, viabilidade espermática e integridade de acrossoma) após o descongelamento, observada nos ejaculados não congeláveis, estaria associada não apenas à maior concentração de HBPs no plasma seminal, mas também à maior concentração de PDC-109 (BSP1). Da mesma forma que no estudo anterior, os ejaculados não congeláveis apresentaram, após o descongelamento, menor conteúdo de colesterol nos espermatozoides, além de maior efluxo desse composto. Esses resultados sugeriram a participação dessas proteínas na alteração da fluidez da membrana plasmática, tornando-a mais susceptível aos danos durante o processo de congelamento-descongelamento.

Estudos *in vitro* também sugeriram que as proteínas HBPs aumentam a suscetibilidade dos espermatozoides de búfalos ao criodano (Harshan et al., 2006; Kumar et al., 2008). Nesses trabalhos, a incubação de espermatozoides epididimários antes do congelamento com diferentes concentrações de HBPs levou ao aumento da motilidade progressiva, da integridade da membrana espermática (teste hiposmótico) e da taxa de penetração muco cervical. Entretanto, após o descongelamento, os espermatozoides epididimários congelados na presença dessas proteínas apresentaram menores valores desses parâmetros, além de menor viabilidade (eosina-nigrosina) e integridade de acrossoma (Giemsa) (Harshan et al., 2006; Kumar et al., 2008). Esses efeitos foram dose dependentes, de forma que quanto maior a concentração das proteínas, maiores os efeitos negativos causados aos espermatozoides (Harshan et al., 2006). Contrariamente aos efeitos apresentados pelas proteínas HBPs, Kumar et al. (2008) demonstraram que os espermatozoides epididimários submetidos ao congelamento após a incubação com a fração do plasma seminal composta apenas por proteínas não ligadoras de heparina (NHBPs) apresentaram, após o descongelamento, aumento da motilidade progressiva, da viabilidade, da integridade da membrana espermática e do acrossoma. Esses efeitos foram dose dependentes, na medida em que as concentrações mais altas dessas proteínas resultaram em maiores acréscimos em cada parâmetro. Além disso, as NHBPs, principalmente quando adicionadas na concentração mais elevada, foram capazes de reduzir os efeitos deletérios causados pelas HBPs. Em conjunto, esses resultados sugerem que as proteínas NHBPs conferiram maior proteção aos espermatozoides epididimários durante o processo de congelamento (Kumar et al., 2008).

Em bovinos, as proteínas BSPs apresentam efeitos deletérios ao espermatozoide, particularmente à membrana plasmática, durante o processo de congelamento (Manjunath et al., 2007). Esses efeitos se devem ao efluxo de colesterol e fosfolípídios da membrana espermática promovido por essas proteínas, cuja intensidade é tempo e concentração-dependentes (Therien et al., 1998, 1999). Dessa forma, a exposição continuada dos espermatozoides ao plasma seminal contendo BSPs leva à contínua remoção desses componentes da membrana plasmática, causando sua desestabilização e, conseqüentemente, tornando o espermatozoide mais suscetível ao criodano (Watson, 2000).

Semelhante a esses trabalhos, os efeitos da proteína PDC-109 (BSP1) sobre a resistência dos espermatozoides de bovinos ao congelamento foram observados a partir da adição de anticorpos contra essa proteína ao ejaculado. Após o descongelamento dos espermatozoides suplementados com esses anticorpos, foi observado o aumento da motilidade total, viabilidade, integridade da membrana espermática e acrossoma, sugerindo que o sequestro da proteína PDC-109 reduziu sua participação na desestabilização da membrana plasmática do espermatozoide durante o congelamento e, conseqüentemente, aumentou a resistência espermática ao criodano (Srivastava et al., 2012).

Além das proteínas descritas anteriormente, foi demonstrado que a incubação de espermatozoides suínos após o descongelamento com as proteínas do plasma seminal PSP-I/PSP-II levou ao aumento da motilidade total e viabilidade espermática até duas horas após o descongelamento. Entretanto, contraditoriamente, a incubação com essas proteínas comprometeu a capacidade fertilizante dos espermatozoides, tendo em vista que foram observadas reduções da taxa de penetração de oócitos e do número médio de espermatozoides por oócito (Caballero et al., 2004). Segundo os autores, os efeitos protetores das PSP-I/PSP-II podem estar relacionados à sua capacidade de interagir com a membrana plasmática dos espermatozoides criocapacitados, prejudicando a habilidade desses de penetrarem o oócito.

Estudos em ovinos sugeriram que as proteínas RSPV14 e RSPV20 protegem os espermatozoides durante a criopreservação, sendo capazes de prevenir ou reverter as alterações na membrana espermática provocadas pelo choque térmico (Barrios et al., 2000; 2005). O efeito protetor dessas proteínas foi evidenciado pelo aumento da porcentagem de espermatozoides apresentando a membrana íntegra após a indução de choque térmico em espermatozoides previamente incubados com a fração do plasma seminal correspondente às proteínas RSP14 e RSP20 ou com cada proteína isoladamente (Barrios et al., 2005). Além disso, essas proteínas foram capazes de reverter os danos na membrana espermática, quando a incubação com a fração do plasma seminal foi realizada após a indução do choque térmico. Nesse estudo, tanto a restauração da estrutura da membrana plasmática pôde ser observada por microscopia eletrônica de varredura, como houve o aumento da porcentagem de espermatozoides com a membrana íntegra, sugerindo o reestabelecimento da impermeabilidade da membrana plasmática ao iodo de propídio (Barrios et al., 2000).

#### 3.4.4. Proteínas do plasma seminal como marcadores de congelabilidade espermática

O papel das proteínas nos processos celulares varia de acordo com suas propriedades, visto que podem estar presentes em múltiplas formas, devido às modificações pós-traducionais (ex., fosforilação e glicosilação), que podem alterar a estrutura, localização e função dessas moléculas (Walsh et al., 2005; Woodsmith et al., 2013). Muito embora as proteínas sejam descritas frequentemente de forma isolada, os processos biológicos são, em sua quase totalidade, coordenados por redes complexas de interações entre proteínas (Barabási e Oltvai, 2004), compondo um sistema integrado constituído por todos os possíveis produtos da expressão gênica, conhecido como proteoma (Wilkins et al., 1995).

Inicialmente, o estudo do proteoma tornou-se possível a partir da descoberta da eletroforese bidimensional, que permitiu a visualização do perfil proteômico de uma amostra em um único gel (Klose, 1975; O'Farrel, 1975). Posteriormente, a partir da criação de bancos de dados contendo o sequenciamento de genes e do desenvolvimento da espectrometria de massas (MS) tornou-se possível identificar, quantificar e caracterizar conjuntos de proteínas, a fim de entender a estrutura e a função de cada molécula no sistema avaliado (Blackstock e Weir, 1999; Yates III, 2000). Atualmente, a proteômica é utilizada como método de escolha em estudos quantitativos e qualitativos que visam avaliar a estrutura, abundância, distribuição e função das proteínas, em suas várias formas, e as interações proteína-proteína que compõem o proteoma de uma célula, tecido ou fluido (Walther e Mann, 2010).

Nas últimas décadas, a proteômica tem sido utilizada em estudos do proteoma do trato reprodutivo, do espermatozoide e do plasma seminal a fim de identificar e caracterizar proteínas ou conjuntos de proteínas envolvidas nos eventos biológicos que ocorrem com a célula espermática *in vivo*, *in vitro* e durante a preservação do sêmen nas diversas espécies de mamíferos (Moura et al., 2006; Zhao et al., 2007; Baker et al., 2010; Macleod e Varmuza, 2013; Dacheux e Dacheux, 2014). Adicionalmente, a proteômica tem sido essencial na busca por biomarcadores para diversas características reprodutivas como qualidade de sêmen, resistência espermática à criopreservação, fertilidade, e alguns distúrbios da reprodução (Shen et al., 2013; Muhammad et al., 2014; Rickard et al., 2015; Vilagran et al., 2015). Nesse contexto, devido à sua importância na modulação da função espermática, as proteínas do plasma seminal têm sido alvo de pesquisas que buscam identificar os componentes proteômicos que determinam a congelabilidade espermática em diferentes espécies como bovina (Jobim et al., 2004), bubalina (Asadpour et al., 2007), equina (Jobim et al., 2011), ovina (Rickard et al., 2015) e suína (Vilagran et al., 2015).

Um dos primeiros trabalhos a relacionar o perfil proteômico do plasma seminal e congelabilidade espermática foi realizado por Jobim et al. (2004). Nesse estudo, os autores utilizaram 2D SDS-PAGE para comparar o perfil proteômico do plasma seminal de touros bovinos classificados como doadores de sêmen de alta e baixa congelabilidade espermática, sendo de alta e baixa congelabilidade aqueles que apresentaram  $\geq 90\%$  e  $< 90\%$  de ejaculados viáveis após o descongelamento. Foram considerados viáveis após o descongelamento, os ejaculados que apresentaram os seguintes parâmetros mínimos: mais de 30% de motilidade; mais de 45% de espermatozoides com acrossoma íntegro; mais de 15% de motilidade após teste de estresse na incubação; menos de 20% de defeitos menores e menos de 30% de espermatozoides defeituosos. A partir da eletroforese 2D SDS-PAGE, foram observados quatro *spots* que apresentaram maior quantidade relativa de proteína em touros de alta congelabilidade – 15-16 kDa, pI 4,7-5,2; 11-12 kDa, pI 4,8-4,9; 13-14 kDa, pI 4,0-4,5 e 16-18 kDa, pI 4,8-5,2; enquanto o *spot* correspondente a 25-26 kDa, pI 6,0-6,5 apresentou maior quantidade relativa de proteína nos touros de baixa congelabilidade. Foi possível a identificação de duas proteínas mais abundantes no grupo de alta congelabilidade: a aSFP (acidic seminal fluid proteins) (11-12 kDa) e a clusterina (16-18 kDa), as quais foram associadas pelos autores à proteção da membrana espermática durante o congelamento.

Recentemente, um estudo foi conduzido com o intuito de determinar as diferenças na abundância das isoformas da proteína BSP1 no plasma seminal de touros *Bos taurus indicus* de diferentes perfis de congelabilidade espermática (Magalhães et al., 2016). Essa característica foi determinada de acordo com a motilidade espermática progressiva após o descongelamento e com as diferenças desse parâmetro avaliado no sêmen fresco e após o descongelamento. Diferenças no perfil proteômico do plasma seminal entre os touros foram observadas na eletroforese 2D PAGE, a partir da qual quatro *spots* foram identificados como sendo isoformas da proteína BSP1. Dentre essas proteínas, a de 15.52 kDa e pI de 5.78 apresentou maior abundância no plasma seminal dos touros caracterizados pelos menores valores de congelabilidade espermática, ao passo que naqueles de maior congelabilidade, essa proteína estava ausente. Esses resultados sugerem que a influência das proteínas BSP1 sobre a resistência do espermatozoide ao congelamento pode variar entre as isoformas, sendo aquela de 15.52 kDa e pI de 5.78 um possível potencializador das injúrias causadas pelo congelamento.

Proteínas do plasma seminal relacionadas à congelabilidade espermática também foram identificadas na espécie equina, em um estudo no qual dez garanhões foram categorizados como sendo de alta ( $> 30\%$ ) ou baixa ( $< 30\%$ ) congelabilidade espermática, de acordo com a porcentagem de ejaculados viáveis após o descongelamento (mais de 35% de motilidade progressiva pós-descongelamento). Diferenças no perfil proteômico entre os dois grupos foram demonstradas na eletroforese 2D SDS-PAGE, na qual foram detectados cinco *spots* presentes apenas no plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade, sendo eles de 25-27 kDa, 26-27 kDa, 14-15 kDa, 11-13kDa e 18,2 kDa. Além disso, seis *spots* diferiram estatisticamente entre os grupos, sendo dois mais abundantes no grupo de alta congelabilidade – 80-85

kDa, pI 7,54 e 18,2 kDa, pI 5,0-5,2, correspondentes às proteínas CRISP-3 e HSP-2, respectivamente. Os quatro *spots* restantes foram mais abundantes no grupo de baixa congelabilidade, correspondendo às proteínas lactoferrina (75,4kDa, pI 8,32), Calicreína 1 (26,7 kDa, pI 5,51), CRISP-3 (25 kDa, pI 7,54) e HSP-1 (13,9 kDa, pI 8,14) (Jobim et al., 2011).

Na espécie suína, Vilagran et al. (2015) utilizaram a eletroforese 2D-DIGE em associação à LC-MS/MS para buscar diferenças entre o proteoma do plasma seminal de ejaculados classificados, por meio de análise de agrupamentos, como de alta e baixa congelabilidade, de acordo com a motilidade total e integridade da membrana espermática após 30 e 240 minutos do descongelamento. As proteínas Fibronectina-1 e a Glutathiona-peroxidase 5 foram identificadas como diferencialmente abundantes no plasma seminal de ejaculados de alta e baixa congelabilidade, mas apenas a Fibronectina-1 foi confirmada por Western Blot, sendo considerada pelos autores como um potencial marcador de congelabilidade espermática nessa espécie.

A despeito da importância que tem sido dada aos efeitos do plasma seminal e suas proteínas sobre a resistência dos espermatozoides ao congelamento, eventualmente marcadores proteômicos da congelabilidade espermática detectados nesse fluido podem ser originados do próprio espermatozoide. Isso foi observado por Rickard et al. (2015) em um estudo que objetivou comparar o proteoma do plasma seminal de ejaculados de carneiros previamente identificados como possuidores de espermatozoides de alta (HSP) ou baixa (LSP) resistência ao congelamento. Os carneiros que apresentaram maior número de ejaculados com pequena diferença entre a motilidade total antes do congelamento e após o descongelamento (0 e 4 horas) foram classificados como HSP e aqueles que apresentaram grande diferença, como LSP. Das proteínas identificadas como mais abundantes no plasma seminal de carneiros HSP, sete proteínas se mostraram altamente correlacionadas à maior resistência espermática ao congelamento, sendo elas PSMD2, APEH, MAN2C1, HSP90AA1, TPP2, VCP e SORD. Por outro lado, seis proteínas, mais abundantes no plasma seminal de carneiros LSP, se mostraram altamente correlacionadas à menor resistência espermática ao congelamento – CST3, AZGP1, ANG, CRTAC1, CTSB e RNASE4. Parte dessas proteínas, como HSP90AA1, TPP2, VCP, AZGP1, foram descritas no espermatozoide, onde participam de processos intracelulares importantes para a função espermática.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA – UMFG), protocolo 357/2015 (ANEXO I).

O desenho experimental compreendeu três etapas consecutivas, como apresentado de forma esquemática na Figura 1. Na primeira etapa, foram obtidas as amostras para o estudo, sendo elas os espermatozoides criopreservados e o plasma seminal. Brevemente, foram realizadas coletas de sêmen de um total de 13 touros búfalo, a fim de se obter um total de 5-10 ejaculados por animal. Os ejaculados coletados foram avaliados quanto às características macro e microscópicas, diluídos em diluidor Tris-frutose-ácido cítrico contendo 10% de lipoproteínas de baixa densidade e submetidos ao processo de congelamento de espermatozoides. Após retiradas as alíquotas para avaliação, diluição e congelamento, o volume restante de sêmen foi tratado com inibidor de protease e centrifugado para a recuperação do plasma seminal, que foi posteriormente armazenado em freezer -80 °C para análise proteômica. Na segunda etapa, realizou-se o estudo da resposta dos espermatozoides obtidos na Etapa I ao processo de congelamento-descongelamento. Para tal, os espermatozoides foram avaliados no sistema CASA quanto aos parâmetros de motilidade e cinética imediatamente após a diluição (pré-resfriamento), após o resfriamento (pré-congelamento), e ao longo de três horas após o descongelamento. A partir dessas avaliações, estudou-se a variabilidade da resposta dos espermatozoides ao congelamento e foi realizada a identificação dos ejaculados quanto à resistência espermática a esse processo, formando-se, assim, dois grupos experimentais: resistência espermática boa e resistência espermática ruim. Por fim, na Etapa III, avaliou-se as diferenças no perfil proteômico e abundância de proteínas do plasma seminal entre os grupos de ejaculados de resistência espermática boa e ruim, classificados na Etapa II, e a relação entre esses achados e a resistência dos espermatozoides de búfalo ao processo de congelamento-descongelamento.

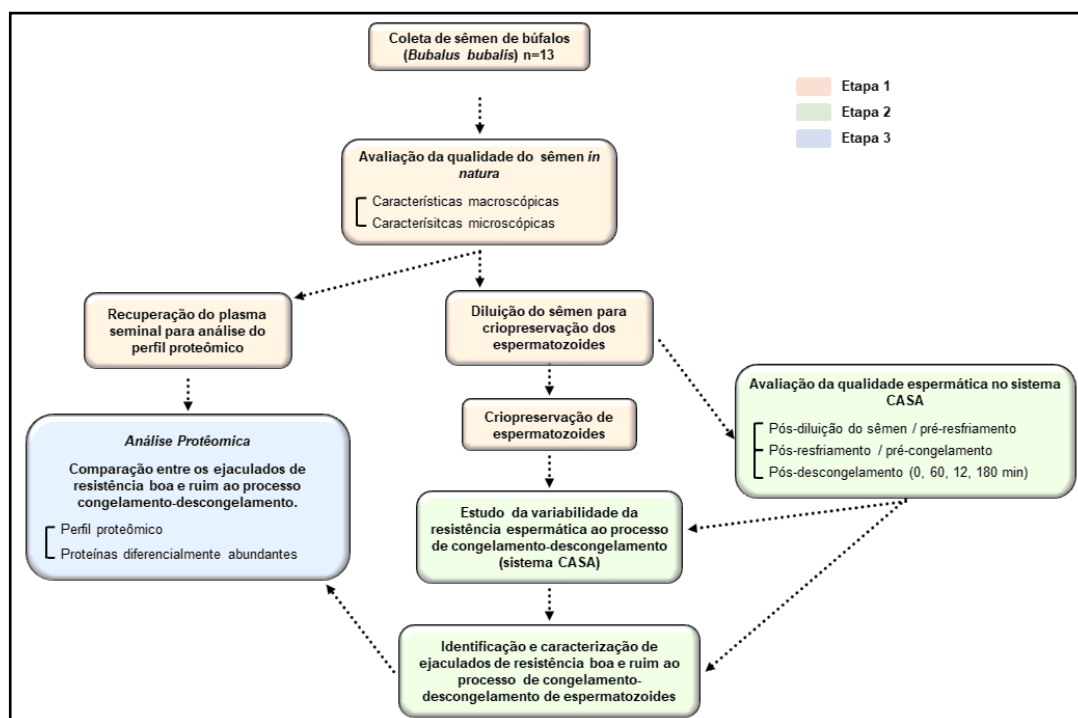


Figura 1. Representação do desenho experimental.

#### 4.1. COLETA DE SÊMEN

##### 4.1.1. Condições experimentais

O experimento a campo foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura (CBB)-Fazenda Modelo da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado no município de Pedro Leopoldo – MG (latitude 19° 37' 05" S e longitude 44° 02' 35" W), entre os meses de abril e dezembro de 2016. As condições climáticas diárias médias durante o período estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados climáticos médios do período experimental

	Média	Máxima	Mínima
<b>Temperatura (°C)</b>	18,9	31,3	11,2
<b>Umidade relativa (%)</b>	66,0	96,5	39,0
<b>Pluviosidade (mm)</b>	25,2	98,0	0,0

Dados obtidos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) - PCD 32513 - Estação: Belo Horizonte/MG, Latitude: -19.877, Longitude: -43.909, Altitude: 991. Os valores representam a média das mensurações diárias de cada parâmetro durante o período de abril a dezembro de 2016.

##### 4.1.2. Animais

Foram utilizados para esse estudo, treze touros búfalo (*Bubalus bubalis*) sexualmente maduros, mantidos sob as mesmas condições de manejo e condicionados à coleta de sêmen por vagina artificial convencional.

Os animais foram previamente submetidos ao exame clínico andrológico com o intuito de incluir no experimento somente aqueles que não apresentassem alterações, perceptíveis ao exame clínico, que pudessem interferir em seu potencial reprodutivo (qualidade seminal (Manual CBRA, 2013) e capacidade de monta, principalmente). Na Tabela 2, são apresentados os dados referentes à idade, peso e escore corporal, perímetro escrotal e consistência testicular dos animais utilizados, avaliados no início do experimento.

Tabela 2. Idade, peso e escore corporal, perímetro escrotal e consistência testicular dos 13 touros búfalos (*Bubalus bubalis*) utilizados para o congelamento de espermatozoides

<b>Características</b>	
Idade (anos)	2,5-6,0 <sup>2</sup> / 4,0 <sup>3</sup>
Peso corporal (Kg)	737 ± 72 <sup>1</sup>
Escore corporal	4,0 <sup>3</sup>
Perímetro escrotal (cm)	33,0 ± 3,1 <sup>1</sup>
Consistência testicular	3 – 4 <sup>2</sup>

Dados obtidos no início do experimento. <sup>1</sup>Média; <sup>2</sup>Mínimo – Máximo; <sup>3</sup>Mediana

##### 4.1.3. Coleta do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas em local sombreado, com temperatura ambiente média local, durante as horas de coleta, de 22,1 °C (15,1 °C – 30,6 °C). Imediatamente antes da coleta, os machos

foram submetidos à higienização prepucial externa por meio da lavagem com água corrente e secagem com papel toalha. Os ejaculados foram obtidos, por um mesmo coletador, pelo método da vagina artificial convencional (42,0 – 45,0 °C), utilizando-se uma fêmea como manequim, devidamente contida. A vagina artificial foi revestida internamente com material plástico descartável estéril, ao qual foi acoplado um tubo coletor graduado, pré-aquecido a 37 °C, protegido, por material isotérmico, das variações de temperatura durante a coleta.

Adotou-se um intervalo de seis a sete dias entre coletas de um mesmo animal, a fim de se obter um total de 5-10 ejaculados submetidos ao processo de congelamento de espermatozoides ao final do período experimental (item 4.4).

## 4.2. AVALIAÇÃO DO SÊMEN *IN NATURA*

### 4.2.1. Características macroscópicas

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi encaminhado ao laboratório para avaliação *in natura* quanto às características físicas, sendo as primeiras, a avaliação do aspecto (aquoso, leitoso e cremoso) e coloração (branco ou amarelo), por meio da observação visual do ejaculado; odor, e a medição do volume pela graduação do recipiente de coleta.

### 4.2.2. Características microscópicas

#### 4.2.2.1. Turbilhonamento

A avaliação do turbilhonamento foi realizada em uma gota de sêmen (5µl) colocada em lâmina previamente aquecida a 37 °C. A avaliação foi realizada, utilizando-se uma escala subjetiva de 0 a 5, sendo 0 ausência de movimento de onda e 5, movimento intenso (Manual do CBRA, 2013).

#### 4.2.2.2. Motilidade total e vigor espermático

Posteriormente, uma alíquota de sêmen foi diluída em meio diluidor comercial e colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C, para as avaliações da motilidade total e vigor espermático. As leituras foram realizadas em microscópio óptico de campo claro em aumento final de 100X e 400X, sendo a motilidade total a média do percentual de células móveis por campo e o vigor espermático, a força do movimento de flagelo e a velocidade de deslocamento das células espermáticas nos campos avaliados, em uma escala subjetiva de 0 a 5, na qual 0 indica ausência de movimento e 5, movimento vigoroso (Manual do CBRA, 2013).

#### 4.2.2.3. Concentração espermática

A determinação da concentração espermática (número de espermatozoides/ml de sêmen) de cada ejaculado foi realizada a partir da diluição (1:200) do sêmen em solução formol-salina tamponada (4,95 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,54 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,4 g de NaCl, 125 ml de formaldeído em 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada) e contagem dos espermatozoides em hematocítmetro (Câmara de Neubauer) observado em microscópio óptico de campo claro (aumento final de 400X). A contagem foi realizada em duplicata, sendo iniciada somente após a sedimentação das células espermáticas, admitindo-se o máximo de 10% de diferença no número de espermatozoides contados entre os dois lados da Câmara.



#### 4.2.2.4. Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia espermática foi utilizada a técnica da câmara úmida, a partir da diluição de 50  $\mu$  de sêmen em 1000  $\mu$ l de solução de formol-salina tamponada (4,95 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,54 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,4 g de  $\text{NaCl}$ , 125 ml de formaldeído em 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), sendo as amostras obtidas a partir dessa preparação conservadas a 4 °C até a avaliação. A leitura foi realizada em microscópio óptico com contraste de fase (Nikon®, modelo E-200), em aumento final de 1000X, por meio da contagem de espermatozoides morfológicamente normais e com patologias da cabeça, peça intermediária, cauda e acrossoma, em um total de 200 células espermáticas (Manual do CBRA, 2013).

#### 4.2.2.5. Integridade funcional da membrana plasmática

A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do sêmen fresco foi realizada pelo teste hiposmótico (HO), adicionando-se 50  $\mu$ l de sêmen a 500  $\mu$ l de solução hiposmótica a aproximadamente 100 mOsm/l (0,735 g de citrato de sódio e 1,351 g de frutose em 150 ml de água mili-Q – Kumar, 2014). Após a incubação em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, a amostra foi fixada adicionando-se 200  $\mu$ l de solução formol-salina tamponada. A leitura das amostras foi realizada em lâmina coberta posteriormente com lamínula, em microscópio com contraste de fase (Nikon®, modelo E-200), em aumento final de 1000X. A avaliação baseou-se na contagem do número de células espermáticas apresentando cauda enrolada ou não, sendo classificadas como reativas ou não reativas, respectivamente, em um total de 100 células. Do valor obtido, foi subtraída a % de células apresentando alterações na região da cauda antes do teste HO, avaliadas na morfologia espermática (item 4.2.2.4), segundo a fórmula abaixo (Melo e Henry, 1999):

% final de células reativas ao teste HO = % de células reativas ao teste HO - % de células com alterações na região da cauda antes do teste HO

### 4.3. PROCESSAMENTO DO SÊMEN PARA O CONGELAMENTO DE ESPERMATOZOIDES

Após a avaliação do sêmen *in natura*, prosseguiu-se com o preparo dos ejaculados para o processo de congelamento de espermatozoides. Somente foram utilizados os ejaculados que não apresentaram alterações de cor sugestivas de contaminação por sangue, urina ou sujidades, e que apresentaram motilidade total maior ou igual a 70%, porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais maior ou igual a 70%, porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores menor ou igual a 10%, e ausência de células redondas na análise microscópica (CBRA, 2013).

#### 4.3.1. Diluição do sêmen

Para a diluição do sêmen e preparo do número de doses a serem congeladas por ejaculado, foi utilizada a concentração espermática obtida pela contagem em câmara de Neubauer (item 4.2.2.3), de forma a obter uma concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides totais/ml.

A alíquota de sêmen destinada ao congelamento foi diluída, em banho-maria a 37 °C, por meio da adição lenta de diluidor Tris-frutose-ácido cítrico contendo 10% de lipoproteínas de baixa densidade (item 4.3.2). Após cuidadosa homogeneização, o sêmen recém-diluído foi mantido a 37 °C até o momento do envase em palhetas de 0,25 ml, realizado imediatamente antes do início do processo de resfriamento, em temperatura ambiente. O tempo entre a diluição do sêmen e o início do resfriamento variou de aproximadamente 30 a 90 minutos, sendo essa variação de 30 a 75 min para o grupo RB e 35 a 90 min para o grupo RR.

#### 4.3.2. Preparo do diluidor

Utilizou-se para este estudo o diluidor Tris-frutose-ácido cítrico contendo 10% de lipoproteínas de baixa densidade, cuja composição está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química do diluidor Tris-frutose-ácido cítrico contendo 10% de lipoproteínas de baixa densidade

<i>Constituintes</i>	<i>Quantidade para 100 ml</i>
TRIS (g)*	2,42
Ácido cítrico (g)*	1,36
Frutose (g)*	1,00
Estreptomicina (g)*	0,10
Penicilina (g)*	0,028
Ldl (g)	10,0
Glicerol (ml)	7,0
Água q.s.p. (ml)	100

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano; Ldl: lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo.

\*Reagentes Sigma-Aldrich®

Osmolaridade: 1394 mOsm; pH: 6,86

Para a extração e obtenção das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo, seguiu-se a técnica descrita por Moussa et al. (2002) e modificada por Neves et al. (2014). Foram utilizados ovos frescos de galinha (*Gallus domesticus*), produzidos em granja comercial, os quais foram previamente lavados com água corrente e sabão neutro e em seguida higienizados com álcool, com o objetivo de reduzir os riscos de contaminação do diluidor.

Com esse mesmo fim, a preparação do meio diluidor foi realizada em local limpo e seco, sendo toda a manipulação durante a dissolução dos reagentes realizada em capela de fluxo laminar. Além disso, foi utilizada água Mili-Q autoclavada e armazenada em garrafas de vidro de um (1) litro esterilizadas, hermeticamente fechadas, e mantidas a 5 °C até o momento do uso.

Ao final do preparo, foram realizadas as mensurações de osmolaridade (1394 mOsm) e pH, o qual foi corrigido com solução de Tris 1,0 M para 6,86. O volume total de diluidor produzido foi alíquotado em tubos graduados de 15 ml e armazenados a -20 °C até o momento do uso, de forma que fosse descongelada apenas a quantidade necessária para o dia de coleta, evitando-se um novo congelamento do diluidor.

#### 4.4. PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO DE ESPERMATOZOIDES

Para o congelamento de espermatozoides, o sêmen diluído em meio Tris-frutose-ácido cítrico contendo 10% de LDL e envasado em palhetas de 0,25 ml foi primeiramente submetido ao processo de resfriamento descrito no item 4.4.1 e, posteriormente, ao congelamento em nitrogênio líquido (item 4.4.2).

#### 4.4.1. Protocolo de resfriamento

O protocolo de resfriamento foi previamente padronizado a fim de se obter as condições nas quais houvesse menor variação da curva de resfriamento entre os dias de coleta. Adotou-se como padrão a curva de resfriamento em que foram obtidos resultados satisfatórios de motilidade total após o descongelamento; e que apresentou menor variação na taxa de queda de temperatura entre os testes durante a padronização, admitindo-se taxa máxima de  $-0,25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do início ao fim do resfriamento.

O resfriamento foi realizado em geladeira com temperatura regulada para  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se cubas em polipropileno de 4,2 litros preenchidas com 2,6 litros de água a aproximadamente  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o envase, as palhetas foram acondicionadas em sacos plásticos e posteriormente inseridas em recipiente de vidro contendo 700 ml de água em temperatura média de  $25,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $24,6\text{ }^{\circ}\text{C} - 25,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), na qual permaneceram submersas durante todo o protocolo. Para o início do resfriamento, o recipiente de vidro contendo as palhetas foi colocado no interior das cubas com água a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (média:  $4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; mínimo:  $4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; máximo:  $5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), mantidas na geladeira.

As amostras foram submetidas às seguintes taxas de resfriamento, de acordo com a curva de resfriamento previamente padronizada:  $-0,26\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $-0,11\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  de  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $-0,06\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As curvas de resfriamento obtidas em todos os congelamentos foram registradas a partir da mensuração da temperatura da água contida no recipiente de vidro (Figura 2). Adotou-se um tempo total de 5 horas do início do resfriamento até o congelamento.

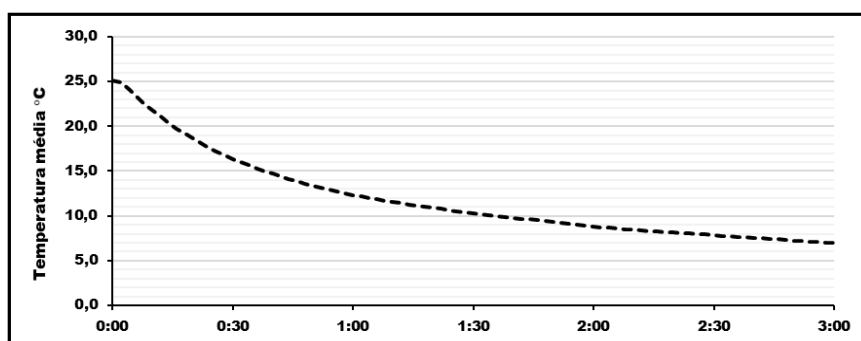


Figura 2. Curva de resfriamento média. A linha pontilhada representa a média dos valores de temperatura ao longo do tempo obtidos a partir de 118 congelamentos de espermatozoides. Tempo máximo apresentado: três horas.

#### 4.4.2. Protocolo de congelamento

Ao final do processo de resfriamento (total de 5 horas), as palhetas foram imediatamente transferidas para um suporte horizontal, e o conjunto disposto no interior de uma caixa de isopor contendo 5,0 cm de nitrogênio líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ). As palhetas foram mantidas 3,0 cm acima da lâmina de  $\text{N}_2\text{L}$  por 20 minutos, a fim de promover o congelamento das amostras no vapor de nitrogênio, sendo essas, após esse período, imersas no  $\text{N}_2\text{L}$  para o armazenamento em container criogênico ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.4.3. Protocolo de descongelamento

Para a avaliação da cinética espermática após o descongelamento, uma palheta de cada ejaculado foi retirada do nitrogênio líquido e imediatamente imersa em água mantida a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram

por 30 segundos. Após esse período, o sêmen diluído contido na palheta foi recuperado e mantido a 37 °C por um período de 180 minutos. O descongelamento das amostras foi realizado no mínimo dois dias após o congelamento.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA

A qualidade dos espermatozoides após o descongelamento foi avaliada a partir dos parâmetros de motilidade e cinética espermática obtidos pela análise computadorizada de sêmen (CASA), utilizando o software Sperm Class Analyzer – SCA® versão 4.0. Essas avaliações foram realizadas em seis momentos, sendo eles: (1º) até uma hora após a diluição, imediatamente antes do resfriamento; (2º) imediatamente antes do congelamento; (3º) 5, (4º) 60, (5º) 120 e (6º) 180 minutos após o descongelamento. O descongelamento e incubação das amostras foi realizado como descrito no item 4.4.3, sendo as leituras após o descongelamento iniciadas após um período de 5 minutos, durante o qual o sêmen diluído recuperado da palheta foi mantido em temperatura de 37 °C.

Para as avaliações, gotas de 5 µl de cada amostra foram colocadas entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C, e avaliadas no CASA (10X, contraste de fase). Foram capturados no mínimo cinco campos aleatórios, com um mínimo de 100 e máximo de 200 células espermáticas em cada um deles. Os parâmetros utilizados para calibração do software foram os seguintes: área da partícula: 20 a 70 microns<sup>2</sup>; VCL (microns/s): 10 < lento < 25 < médio < 50 < rápido; Progressividade: > 70% do STR; Circular: < 50% LIN; VAP: 5 pontos; Conectividade: 12.

Foram obtidos os seguintes parâmetros de motilidade espermática, calculados pelo software: motilidade total; progressiva (%) – motilidade progressiva; células rápidas (%); VSL (µm/s) – velocidade linear; VAP (µm/s) – velocidade média da trajetória; VCL (µm/s) – velocidade curvilínea; linearidade (%); STR (%) – retilinearidade; ALH (µm) – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF (Hz) – frequência do batimento do flagelo.

#### 4.6. ESTUDO DA RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA AO PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO

O estudo da resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento foi realizado a partir da avaliação, no CASA, dos parâmetros de motilidade e cinética espermática, principalmente da motilidade total.

Primeiramente, foi realizada a caracterização da variação da resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento, a partir da sobrevivência dessas células ao congelamento e à sua longevidade após o descongelamento. Essas características foram determinadas pela motilidade total obtida a partir das avaliações realizadas antes do congelamento e durante a incubação após o descongelamento. A avaliação da variabilidade foi realizada tanto entre o total de ejaculados coletados, como entre os animais (inter-indivíduo) e entre os ejaculados de cada animal (intra-indivíduo).

Após o estudo da variabilidade da sobrevivência e da longevidade dos espermatozoides após o descongelamento, foi realizada a identificação e caracterização dos ejaculados que apresentaram os espermatozoides com maior e menor resistência ao congelamento-descongelamento. Considerou-se um período de incubação após o descongelamento de 180 minutos, assim, a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento foi determinada pela diferença entre a motilidade total antes do início do processo, ou seja, imediatamente antes do resfriamento e aquela obtida ao final do período de incubação pós-descongelamento, após 180 minutos do descongelamento. Essa diferença foi referida como declínio da motilidade total e representada pelo símbolo  $\Delta R_{(MT)}$ .

A partir dos percentis 25 e 75, calculados para esse parâmetro em todos os ejaculados coletados, foram definidos dois grupos experimentais, sendo eles ejaculados de resistência espermática boa (RB) e de resistência espermática ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento. O grupo RB foi formado pelos ejaculados que obtiveram o menor declínio da motilidade total do início do resfriamento ao fim da incubação pós-descongelamento, sendo aqueles que apresentaram valores de  $\Delta R_{(MT)}$  abaixo do percentil 25. E, por sua vez, o grupo RR foi formado pelos ejaculados que obtiveram o maior declínio da motilidade total no mesmo período, apresentando valores de  $\Delta R_{(MT)}$  acima do percentil 75. Devido à utilização da motilidade total referente à apenas um momento após o descongelamento (180 minutos) para a formação dos dois grupos, foram excluídos os ejaculados que apresentaram grande variação nesse parâmetro durante a incubação após o descongelamento. Dessa forma, aumentou-se a homogeneidade entre as observações dentro de cada grupo, no que se refere à longevidade dos espermatozoides após o descongelamento.

#### 4.7. ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL

##### 4.7.1. Obtenção do plasma seminal

O plasma seminal de cada ejaculado foi recuperado para posterior avaliação do perfil proteômico. Assim, ao volume restante do ejaculado, após a avaliação do sêmen fresco e retiradas as alíquotas para as leituras de concentração e morfologia espermáticas e para a diluição do sêmen para o congelamento (itens 4.2 e 4.3), foi adicionado coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich®, P8340), na diluição de 1:1000. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 700 g a 4 °C, por 15 minutos, sendo o sobrenadante (plasma seminal) recolhido e colocado em outro tubo, submetido, posteriormente, à nova centrifugação (10.000 g a 4 °C por 60 minutos), para remoção de qualquer célula espermática residual e debris celulares. Finalizada a centrifugação, o plasma seminal foi alíquotado em palhetas de congelamento de sêmen de 0,5 ml e armazenado a -80 °C até o momento da análise.

##### 4.7.2. Seleção dos ejaculados e formação dos grupos experimentais

Para a análise proteômica, do total de ejaculados obtidos após a classificação baseada nos percentis do  $\Delta R_{(MT)}$  (item 4.6), foram selecionados nove ejaculados categorizados como de resistência espermática boa e oito categorizados como de resistência espermática ruim, totalizando 17 ejaculados. A seleção das amostras foi realizada de acordo com o desenho experimental apresentado na Figura 3.

Para os grupos *RBp* e *RRp*, foram selecionados os ejaculados pertencentes a animais que tiveram maior proporção de ejaculados classificados como de resistência boa e ruim, respectivamente. A partir desse critério, foram selecionados dois ejaculados por animal, quando possível, em um total de três animais. Assim, o grupo *RBp* foi formado por seis ejaculados referentes a três animais, enquanto o grupo *RRp* foi formado por um total de cinco ejaculados referentes a três animais. O terceiro grupo, denominado *RBp/RRp*, foi formado por ejaculados pertencentes a três animais, os quais foram classificados como de resistência espermática intermediária, por apresentarem proporções semelhantes de ejaculados de resistência espermática boa e ruim. Dessa forma, foram selecionados para esse grupo, seis ejaculados pertencentes a três animais, de modo que cada animal apresentasse dois ejaculados, sendo um classificado como de resistência espermática boa (*RBp*) e o outro, como de resistência espermática ruim (*RRp*). Para compor cada subgrupo, foram selecionados os animais e seus respectivos ejaculados, que apresentaram maior homogeneidade na resposta ao congelamento-descongelamento (de acordo com a variável motilidade total). O delineamento descrito acima foi escolhido para a análise proteômica por permitir avaliar diferenças no perfil proteômico do plasma seminal tanto entre animais como entre ejaculados.

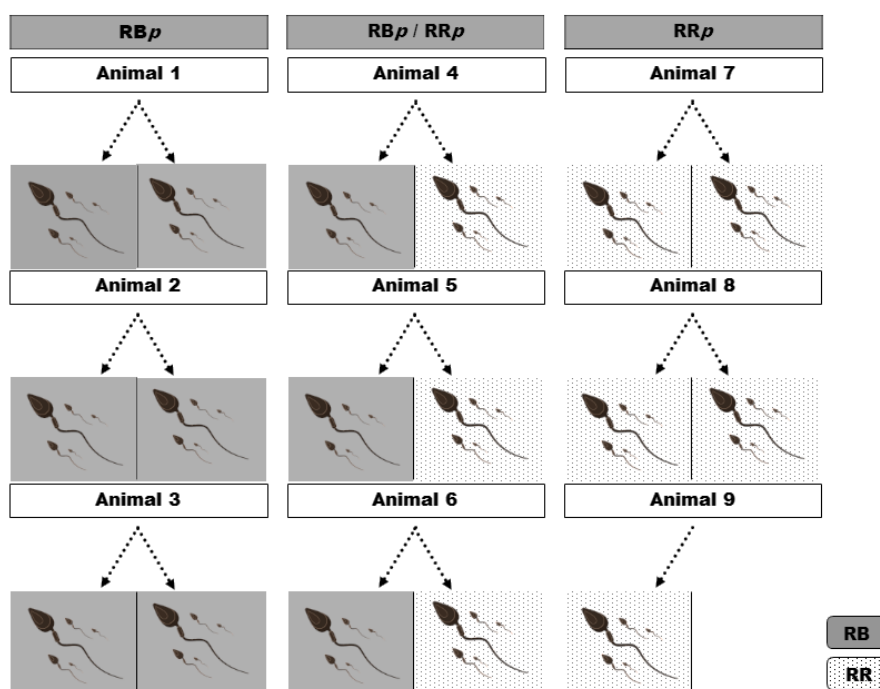


Figura 3. Desenho experimental da seleção dos ejaculados para a análise proteômica do plasma seminal. RB: ejaculados de resistência espermática boa; RR: ejaculados de resistência espermática ruim. Cada quadrado cinza (claro ou escuro) corresponde a um ejaculado. RB $p$  e RR $p$ : grupos de ejaculados pertencentes a animais que tiveram maior proporção de ejaculados classificados como de resistência boa e ruim, respectivamente; RB $p$ /RR $p$ : grupo de ejaculados pertencentes a animais que apresentaram proporções semelhantes de ejaculados de resistência espermática boa e ruim.

#### 4.7.3. Concentração proteica do plasma seminal

A determinação da concentração proteica do plasma seminal foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) para a curva padrão de proteína.

#### 4.7.4. SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio)

A SDS PAGE foi utilizada para confirmar por estimação a concentração proteica obtida pelo método de Bradford, e para verificar a qualidade das proteínas da amostra. Para a realização dessa técnica, foram aplicados 20  $\mu$ g de proteína de cada amostra de plasma seminal em gel SDS-PAGE contendo 12% de acrilamida, corado posteriormente por *coomassie brilliant blue R-250* (Neuhoff et al., 1988).

#### 4.7.5. Avaliação do perfil proteômico individual

Após a verificação da qualidade e da concentração proteica das amostras de plasma seminal, foi realizado um estudo do perfil proteômico individual (de cada amostra de plasma seminal), assim como da variação do perfil proteômico intra-indivíduo. Para isso, para cada ejaculado (plasma seminal), foi realizada a técnica de eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE), como descrito no item 4.7.6, utilizando-se strips de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 4 a 7 (GE-Healthcare), com 7 cm de

comprimento. Após a obtenção dos géis, esses foram corados (item 4.7.6), digitalizados utilizando-se o scanner ImageScanner (Amersham Biosciences) e analisados no software ImageMaster™ 2D Platinum versão 6.0 (GE Healthcare, Suécia).

A variação do perfil proteômico foi avaliada a partir da análise dos *spots* comuns entre as imagens dos géis individuais, utilizando como parâmetro para comparação a porcentagem de volume de cada *spot*, que indica o volume do *spot* avaliado em relação ao volume total de todos os *spots* no gel, de acordo com a fórmula:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100$$

A partir desse parâmetro, foram obtidos gráficos de dispersão, coeficientes de correlação e equações de regressão indicativos da similaridade entre os perfis proteômicos dos ejaculados do mesmo animal. Além disso, por meio do software ImageMaster™ 2D Platinum versão 6.0 (GE Healthcare, Suécia), foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico (*heuristic clustering*) com o intuito de classificar os géis de acordo com a porcentagem de volume dos *spots* comuns entre eles ( $n = 17$ ). O objetivo dessa análise foi verificar se o agrupamento dos ejaculados de acordo com o perfil proteômico do plasma seminal corresponderia à classificação e formação dos grupos experimentais de acordo com a resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento.

#### 4.7.6. 2D SDS-PAGE

Primeiramente, foi realizada a separação das proteínas por focalização isoeétrica (IEF, isoelectric focusing), utilizando strips de gradiente de pH imobilizado (IPG, immobilized pH gradient) de 4 a 7 (GE-Healthcare), de 7 ou de 18 cm de comprimento, dependendo da análise a ser realizada (avaliação do perfil proteômico individual ou DIGE, respectivamente). As strips foram hidratadas com determinada quantidade de proteína de cada amostra (150 µg para strips de 7 cm ou 750 µg para strips de 18 cm), tampão IEF (8M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% Azul de Bromofenol) e 1% anfólitos IPG buffer pH 4-7, em um volume total de 125 µl ou 340 µl por strip (7 ou 18 cm, respectivamente). A hidratação das strips foi realizada em temperatura ambiente por 12 horas. Em seguida, as strips foram submetidas à IEF no equipamento Ettan™IPGPhor 3 (GE-Healthcare), a 50 µA/gel com as seguintes condições: 500 V por 4 horas; 1000 V por 1 hora; 8000 V por 2 horas; 8000 V até acumular 40000 ou 64000 Vh (strips de 7 ou 18 cm, respectivamente), e 500 V por uma hora.

Posteriormente à primeira dimensão, as strips foram equilibradas, para redução e alquilação das proteínas, a partir da incubação em tampão de equilíbrio (50 mM de Tris 1,5 M pH 8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% dodecil Sulfato de sódio - SDS, 0,001% v/v azul de bromofenol a 0,5%), ao qual foram adicionados 10 mg/ml de ditioneitol (DTT), por 15 minutos, sob leve agitação. Em seguida, as strips foram transferidas para nova solução tampão de equilíbrio, de mesma constituição que a primeira, substituindo-se o DTT por 25 mg/ml de Iodoacetamida. Após a incubação nessa solução por 15 minutos, sob leve agitação, as strips foram posicionadas horizontalmente na parte superior do gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, sendo cobertas com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol 0,002%.

A eletroforese foi realizada de acordo com a strip utilizada: para as strips de 7 cm de comprimento, foi utilizado o aparelho Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIO-RAD), sendo a corrida limitada a 70 V, 170 mA e 100 W nos primeiros 20 minutos e, após esse tempo, a corrente foi aumentada para 100 V e 170 mA a 100 W, até a completa descida da amostra no gel. Para as strips de 18 cm, a eletroforese foi realizada em aparelho de eletroforese vertical Ettan DALTsix Electrophoresis Unit (GE – Healthcare), sendo a corrida dos géis limitada a 50 V/gel e 25 mA/gel a 4 °C nos primeiros 20 minutos

e, após esse tempo, a corrente foi aumentada para 100 V/gel e 50 mA/gel a 4 °C, até a completa descida da amostra no gel.

Para a coloração, os géis bidimensionais foram colocados em solução fixadora contendo ácido ortofosfórico 2% e etanol 30%, por 12 horas em temperatura ambiente. Após esse período, os géis foram submetidos a três lavagens de 10 minutos cada em solução contendo ácido ortofosfórico 2%, sendo, em seguida, imersos em solução contendo ácido ortofosfórico 2%; etanol 18% e sulfato de amônio 12% por 30 minutos. Finalmente, à essa solução foi acrescentado 0,1% de *coomassie brilliant blue G-250* 4% (GE – Healthcare) para a coloração das proteínas. Os géis foram mantidos imersos nessa solução por um período de 5 dias (Neuhoff et al., 1988), após o qual o background foi removido a partir da lavagem dos géis com etanol 20%.

#### 4.7.7. Eletroforese diferencial (*Difference in-gel electrophoresis*, DIGE)

Após a avaliação do perfil proteômico do plasma seminal individual por eletroforese 2D-SDS PAGE, utilizou-se a técnica eletroforese em gel diferencial (DIGE) para avaliar as diferenças na abundância de proteínas no plasma de seminal entre os ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento. Para isso, para cada grupo experimental (RBP: n = 6 e RRP: n = 5 – item 4.7.2), foi realizado um pool de amostras, a partir da dosagem individual de proteínas (item 4.7.3), de forma que cada pool contivesse 150 µg de proteína de cada amostra de plasma seminal. Após formados, os pools foram delicadamente homogeneizados. Antes da realização da técnica DIGE, foi avaliada a qualidade dos pools produzidos a partir de cada grupo por 2D SDS-PAGE, assim como descrito no item 4.7.6.

Após a confirmação da qualidade dos pools, prosseguiu-se com a DIGE. Assim, previamente da adição dos corantes fluorescentes às amostras, mensurou-se o pH das amostras (pools), considerando que o pH ideal para a ligação corante-proteína é 8,5. Não sendo necessário o ajuste do pH, prosseguiu-se com a marcação das amostras com os fluoróforos CyDye™ – Cy2, Cy3 e Cy5 (GE Healthcare). Essa marcação foi realizada de acordo com o delineamento experimental apresentado na Tabela 4, dividindo-se o volume de cada pool em três tubos distintos, aos quais foram adicionados os diferentes fluoróforos (Dye Swab com Cy3 e Cy5), invertendo-se a marcação das amostras. O padrão interno foi preparado a partir da mistura de ambas as amostras, sendo o volume de cada amostra referente à mesma quantidade de proteína. O volume obtido do padrão interno foi marcado com o fluoróforo Cy2 e dividido entre os géis (Tabela 4). Foi utilizado para a marcação 400 pmol de cada fluoróforo (Cy2, Cy3 e Cy5) para 50 µg de proteína.

Posteriormente à adição dos fluoróforos, as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas rapidamente e mantidas no gelo por 30 minutos, ao abrigo da luz. Após esse período, os volumes referentes às amostras marcadas com os três fluoróforos diferentes, foram misturados de forma a se obter uma única amostra de plasma seminal para cada gel (Tabela 4). À cada amostra, foi acrescentado 1,0 µl de L-lisina 10 mM, com o objetivo de interromper a marcação das proteínas com os fluoróforos, sendo as amostras mantidas no gelo por 10 minutos, ao abrigo da luz. Para cada gel DIGE, à mistura final obtida (amostras + fluoróforos) foram adicionados 500 µg de proteína de determinado grupo, para que ao final da análise DIGE, a coloração com *coomassie brilliant blue G250* permitisse a visualização dos *spots* no gel e extração para a espectrometria de massas. Assim, em cada gel, foram adicionados 150 µg de proteína marcada com os fluoróforos e mais 500 µg de proteína do grupo RBP ou RRP.



Tabela 4. Delineamento experimental para a marcação das amostras com os fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5, para a análise de eletroforese 2D-DIGE

<i>Gel nº</i>	<i>Cy3 (50 µg)</i>	<i>Cy5 (50 µg)</i>	<i>Cy2 (50 µg)*</i>
1	Pool RRp	Pool RBp	RBp + RRp (Padrão interno)
2	Pool RBp	Pool RRp	RB p+ RRp (Padrão interno)
3	Pool RRp	Pool RBp	RBp + RRp (Padrão interno)

\*Em cada gel foram adicionados 50 µg de proteína marcadas com o fluoróforo Cy2, correspondendo a 25 µg do pool RB e 25 µg do pool RR.

Em seguida, prosseguiu-se com a eletroforese bidimensional, utilizando strips de 18 cm pH 4-7, realizada como descrito anteriormente no item 4.7.6. Imediatamente após o término da segunda dimensão, os géis foram digitalizados no scanner Typhoon FLA 9000 (GE-Healthcare), utilizando os seguintes parâmetros para excitação e emissão da fluorescência: Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) e Cy5 (633/670 nm).

#### 4.7.8. Análise dos géis DIGE

As imagens obtidas a partir dos géis DIGE foram importadas para o software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software versão 7.2 (GE - Healthcare), sendo por meio desse realizada uma análise automatizada das imagens obtidas, incluindo detecção, quantificação, sobreposição das imagens e análise estatística dos resultados. A análise no software se baseou nas imagens obtidas a partir dos três géis escaneados (Tabela 4), sendo possível visualizar imagens distintas referentes ao perfil proteômico de cada grupo experimental, devido às marcações com fluoróforos diferentes.

Inicialmente, foi realizada a detecção e quantificação dos *spots* pelo software, delimitada de acordo com os seguintes parâmetros: inclinação (*Slope*), volume, área e o tamanho do pico. Em seguida, foi necessária a edição manual dos *spots* detectados, a fim de excluir da análise artefatos que possam ter sido detectados a partir dos parâmetros utilizados. Após a edição dos *spots*, as três imagens de cada amostra foram avaliadas quanto à qualidade de sua reprodutibilidade.

Para a análise da expressão diferencial de proteínas as três imagens de cada amostra, marcadas com Cy3 e Cy5, foram agrupadas e comparadas por sobreposição (*match*) no modo Match Mode do software. Após a minuciosa revisão e edição, quando necessária, de todos os *matches*, os *spots* foram submetidos ao teste T-student. Os *spots* que apresentaram  $p \leq 0,05$  e  $average\ ratio \geq 1,5 / \leq -1,5$  foram considerados como diferencialmente abundantes e selecionados para a identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF.

#### 4.7.9. Espectrometria de Massas – MALDI-TOF/TOF

Para a identificação das proteínas correspondentes ao *spots* selecionados no software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software versão 7.2 (GE - Healthcare) (item 4.7.8), os mesmos foram excisados do géis, fragmentados manualmente e, posteriormente descorados por meio de três lavagens de 15 minutos, sob constante agitação, com 400 µl de solução de acetonitrila 50% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. Após a remoção da solução descorante, os *spots* foram desidratados com 200 µl de acetonitrila P.A., durante 5 minutos ou até os fragmentos do gel se tornarem opacos. Após a secagem, prosseguiu-se com a digestão enzimática das proteínas, adicionando-se aos fragmentos de gel 10 µl de

tripsina 20 ng/μl (Promega, USA), mantendo as amostras no gelo. Após 30 minutos de incubação, foram adicionados 20 μl de bicarbonato de amônio 50 mM, sendo as amostras mantidas a 37 °C por 16 a 24 horas, para a completa digestão e fragmentação das proteínas.

Ao final do tempo de incubação, as soluções contendo tripsina e bicarbonato de amônio foram coletadas e transferidas para tubos novos e, ao tubo anterior, contendo os fragmentos de gel, foi adicionada solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila 50%, mantendo os tubos por 30 minutos sob agitação constante. Após esse período, a solução contida no tubo foi recuperada e transferida para o tubo contendo a primeira alíquota de solução de tripsina e bicarbonato de amônio recuperada (excesso de solução que não foi absorvido pelo gel durante a digestão enzimática). O procedimento anterior foi repetido, sendo novamente recuperado o sobrenadante, o qual foi adicionado ao tudo que continha os dois outros extratos. Posteriormente, o tubo contendo os três extratos de cada amostra foi colocado no aparelho Concentrator Plus® (Eppendorf, USA), a fim de concentrar as amostras até o volume final de aproximadamente 10 μL. Os extratos obtidos foram passados em colunas ZipTip®C18 (Millipore, USA) para dessalinização e concentração dos peptídeos.

Em seguida, aproximadamente 0,5 μl da amostra concentrada foi misturado com 0,25 ml de uma solução saturada de matriz (10 mg/ml α-ciano-4-hidroxicinâmico (Aldrich, Milwaukee, WI) em solução 50% acetonitrila/0,1% de ácido trifluoroacético). As amostras foram aplicadas na placa MTP AnchorChip™ 600/384 (Bruker Daltonics) e deixadas secando em temperatura ambiente.

Os dados brutos para a identificação das proteínas foram obtidos no espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF Autoflex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), com o instrumento operando no modo positivo/refletor, controlado pelo software FlexControl™. A calibração do instrumento foi realizada utilizando-se peptídeos de calibração padrão II (Bruker Daltonics) como referência. Picos de contaminação de tripsina e queratina foram excluídos da lista utilizada na pesquisa em banco de dados. Cada espectro foi produzido pela acumulação de dados a partir de 400 disparos consecutivos do laser.

Os dados resultantes dos espectros de massa obtidos a partir de cada *spot*, no modo MS e MS/MS, foram armazenados e transferidos para o software Bruker Daltonics BioTools 3.2™, no qual foi realizada a pesquisa no banco de dados de proteínas do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI) e do SwissProt, a partir do software MASCOT® (Matrix Science, USA – <http://www.matrixscience.com>). Foram utilizados os seguintes parâmetros para a busca no banco de dados: tripsina como protease; máximo de duas clivagens perdidas; modificação fixa: carbamidometilação (C); modificação variável: oxidação (M); carga 1+; tolerância da MS: 0,6 % e da MS/MS: 0,5 Da. Apenas proteínas com valores de score significativos foram consideradas na identificação.

#### 4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva da motilidade total e do declínio da motilidade total foi utilizada para o estudo da variabilidade da resistência espermática ao congelamento e classificação dos ejaculados como sendo de resistência boa (RB) ou ruim (RR), para a formação dos grupos experimentais.

Os dados referentes às características espermáticas e seminais, e à concentração proteica do plasma seminal foram avaliados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e igualdade de variâncias. Para as variáveis que assumiram os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, as médias entre os dois grupos experimentais – ejaculados de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento, foram comparadas por análise de variância (ANOVA), assumindo o ejaculado como unidade experimental. Para as características espermáticas, avaliadas em diferentes momentos durante o congelamento-descongelamento, foi analisada a significância estatística

da interação Grupo (RB e RR) X Momento (pré-resfriamento, pré-congelamento, 5, 60, 120 e 180 minutos após o descongelamento). Quando a interação entre essas duas variáveis não foi significativa, os efeitos do grupo em cada momento e do momento dentro de cada grupo foram avaliados separadamente.

As variáveis qualitativas ou quantitativas que não respeitaram os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, mesmo após a transformação dos dados, foram submetidas à análise não-paramétrica. Nesse caso, para as variáveis estudadas em diferentes momentos, os efeitos do grupo (RB e RR) e do momento de avaliação foram avaliados separadamente pelos testes de Mann Whitney e Friedman, respectivamente. Para todas as análises, foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. VARIACÃO INTER E INTRA-INDIVÍDUO NA RESISTÊNCIA DOS ESPERMATOZOÍDES DE BÚFALO (*Bubalus Bubalis*) AO PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO

#### 5.1.1. Variação entre ejaculados de diferentes indivíduos

Um total de 118 ejaculados coletados dos 13 touros apresentaram os critérios mínimos utilizados neste estudo para o congelamento de espermatozoides. Na análise individual dos ejaculados, observou-se o declínio da motilidade total entre a avaliação do sêmen diluído imediatamente antes do resfriamento (PR) e após 180 minutos de incubação pós-descongelamento (PD\_T180) (Figura 4).

No entanto, apesar da redução da porcentagem de espermatozoides móveis do início do resfriamento (PR) ao fim do período de incubação pós-descongelamento (PD\_T180) ser apresentada por todos os ejaculados, uma grande variação na amplitude dessa redução pôde ser observada, principalmente nas avaliações realizadas nos momentos finais da incubação (Figura 4). Todos os ejaculados apresentaram motilidade total acima de 80% quando foram submetidos ao resfriamento (PR). Pequena queda da porcentagem de célula móveis ocorreu após o resfriamento (PC), sendo todos os ejaculados submetidos ao congelamento com motilidade total acima de 70%. Após o descongelamento (PD\_T5), observou-se o aumento da variação na porcentagem de espermatozoides móveis entre os ejaculados, com aumento crescente da diferença entre aqueles que apresentaram a maior e a menor motilidade total em cada tempo de avaliação.

Essa variação está caracterizada na Figura 4 por *boxplots* construídos a partir da motilidade total para cada momento de avaliação do início do resfriamento (PR) até o fim da incubação pós-descongelamento (PD\_T180). Por meio desses gráficos, verifica-se o aumento da dispersão dos valores de motilidade total ao longo do tempo, com variação de 84,3% a 99,6% na avaliação pré-resfriamento (PR), 78,3% a 98,6% na avaliação pré-congelamento (PC), e de 51,9% a 97,1%, 49,7% a 94,8%, 19,7% a 89,9% e 0% a 79,42% nos momentos 5, 60, 120 e 180 minutos após o descongelamento.

Quando avaliado o declínio da motilidade total entre as avaliações pré-resfriamento e 180 minutos após o descongelamento, uma variação de aproximadamente 20% a 100% foi observada entre os ejaculados. Considerando-se o congelamento e o período pós-descongelamento como duas etapas distintas, foram observadas reduções da motilidade total entre 0% e 45% no congelamento (entre as avaliações PR e PD\_T5), enquanto maior variação foi obtida durante a incubação pós-descongelamento (PD\_T5 a PD\_T180 minutos), no qual os valores máximo e mínimo foram de aproximadamente 0% e 80%.

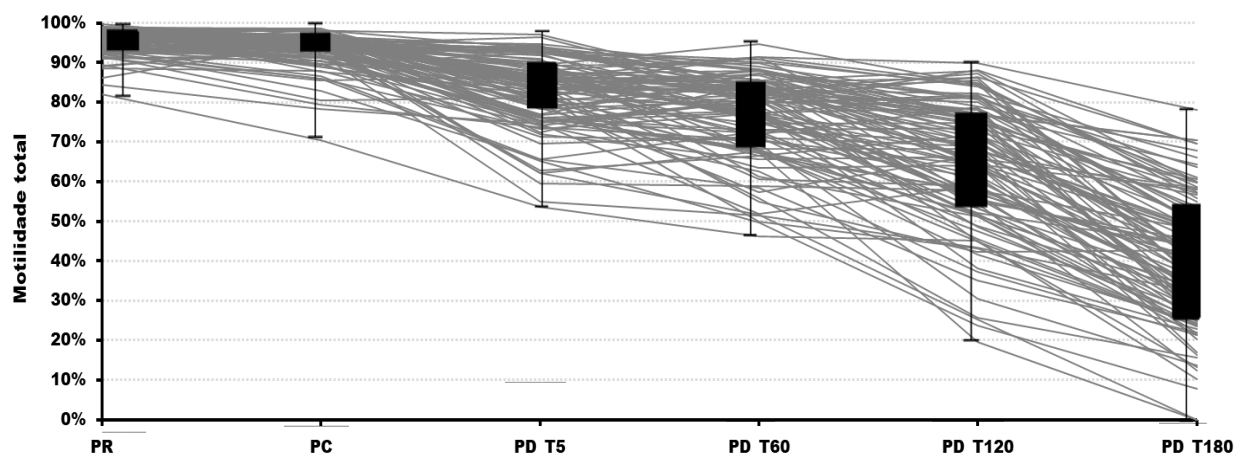


Figura 4. Motilidade total individual ao longo do período compreendido entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento de espermatozoides de búfalo. Dados apresentados individualmente para cada ejaculado ( $n = 118$ ). *Boxplots* em cada momento de avaliação representam a dispersão dos valores de motilidade total obtidos de cada ejaculado. PR: pré-resfriamento (até uma hora após a diluição e imediatamente antes do resfriamento); PC: pré-congelamento (imediatamente antes do congelamento); PD\_T5: 5 minutos pós-descongelamento; PD\_T60: 60 minutos pós-descongelamento; PD\_T120: 120 minutos pós-descongelamento; PD\_T180: 180 minutos pós-descongelamento.

#### 5.1.2. Variação inter-indivíduo

A fim de avaliar a variação entre os animais e entre os ejaculados de cada animal na resistência dos seus espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento, dos 13 touros utilizados como doadores de sêmen, foram selecionados aqueles dos quais obteve-se um mínimo de oito ejaculados submetidos ao congelamento-descongelamento. Na Figura 5, estão apresentadas as médias da motilidade total obtidas a partir de 8-11 ejaculados/touro de 11 animais. Observou-se que a motilidade total média em cada momento de avaliação é muito similar entre os doadores, principalmente até 60 minutos após o descongelamento, momento no qual apenas a média de um animal se distancia das demais. Aos 120 e 180 minutos após o descongelamento, observa-se um aumento da variação da motilidade total média.

Considerando-se apenas as avaliações pré-resfriamento (PR) e após o descongelamento nos momentos 5 (PD\_T5) e 180 minutos (PD\_T180), as quais correspondem à motilidade total inicial, pós-congelamento e ao final da incubação após o descongelamento, respectivamente, observou-se que todos os animais apresentaram médias bastante similares tanto no início do processo (barra cinza) quanto após o congelamento (barra preta). No entanto, aos 180 minutos pós-descongelamento (barra tracejada), uma variação de aproximadamente 20% a 60% nas médias da motilidade total foi observada entre os animais. Os menores valores médios foram apresentados pelos animais A (30,9%), B (27,4%) e J (22,93%), e os maiores, pelos animais D (50,0%), F (56,0%), H (55,3%) (Figura 6).

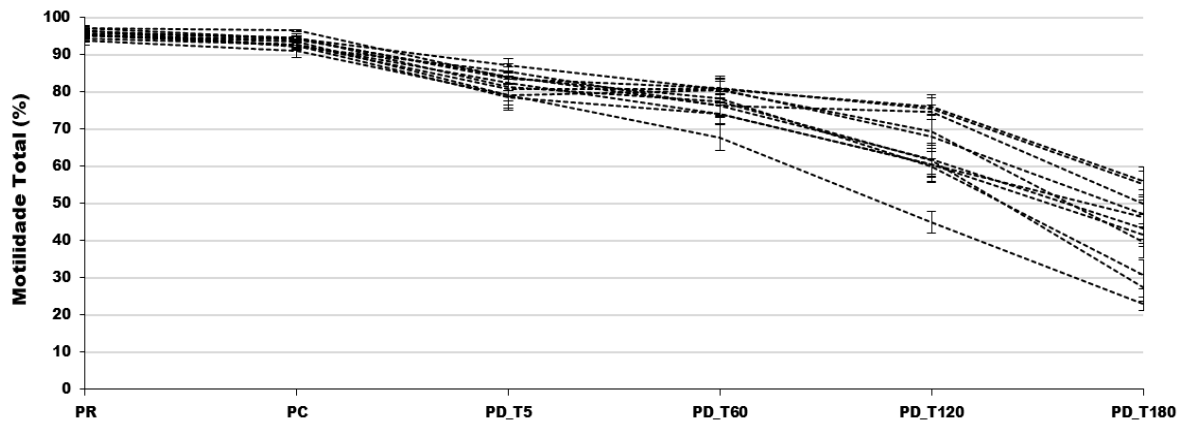


Figura 5. Média da motilidade total de espermatozoides de búfalos, por animal, ao longo do período compreendido entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento. Dados apresentados como média e erro-padrão da motilidade total de 8 a 11 ejaculados para cada animal ( $n = 11$ ), por momento de avaliação. PR: pré-resfriamento (até uma hora após a diluição e imediatamente antes do resfriamento); PC: pré-congelamento (imediatamente antes do congelamento); PD\_T5: 5 minutos pós-descongelamento; PD\_T60: 60 minutos pós-descongelamento; PD\_T120: 120 minutos pós-descongelamento; PD\_T180: 180 minutos pós-descongelamento.

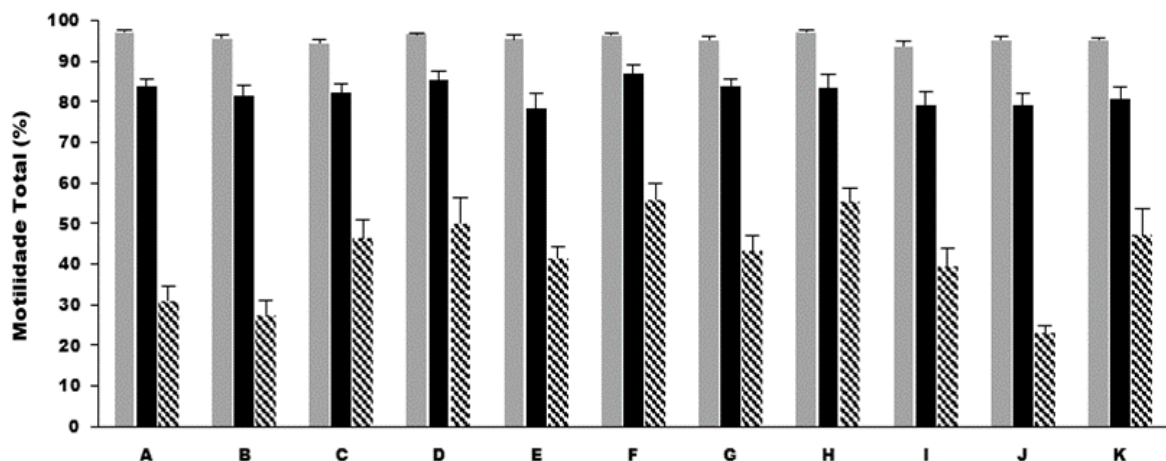


Figura 6. Média da motilidade total de espermatozoides de búfalos, por animal, antes e após o congelamento e ao final da incubação pós-descongelamento. Dados apresentados como média e erro-padrão da motilidade total de 8 a 11 ejaculados para cada animal (A-K). (■) Avaliação pré-resfriamento (até uma hora após a diluição e imediatamente antes do resfriamento); (■) Avaliação 5 minutos após o descongelamento; (▨) Avaliação 180 minutos após o descongelamento.

Quando avaliado o declínio médio da motilidade total do início do resfriamento ao fim da incubação pós-descongelamento (diferença entre as avaliações PR e PD\_T180 – barra cinza), observou-se uma variação de 40% a 70%, aproximadamente, entre os animais (Figura 7). Os maiores valores médios de declínio da motilidade total entre as duas avaliações foram observados nos animais A (66,3%), B (68,3%) e J (72,4%), enquanto os animais F (40,5%) e H (42,0%) apresentaram os menores valores. Resultado similar foi encontrado quando se avaliou o declínio médio da motilidade total no período pós-descongelamento (diferença entre as avaliações PD\_T5 e PD\_T180 – barra preta). Novamente, os maiores valores foram apresentados pelos animais A (53,0%), B (54,1%) e J (56,3%), e os menores,

pelos animais F (31,1%) e H (28,3%). Na Figura 7, é possível visualizar que grande parte do declínio médio da motilidade total observado do momento PR ao PD\_T180 ocorreu no período de incubação pós-descongelamento, no qual foi observada uma variação de 30% a 55% entre os animais. Os valores médios de declínio da motilidade total entre o início do resfriamento e 5 minutos após o descongelamento (PR – PD\_T5 – barra tracejada) foram bastante similares entre os animais.

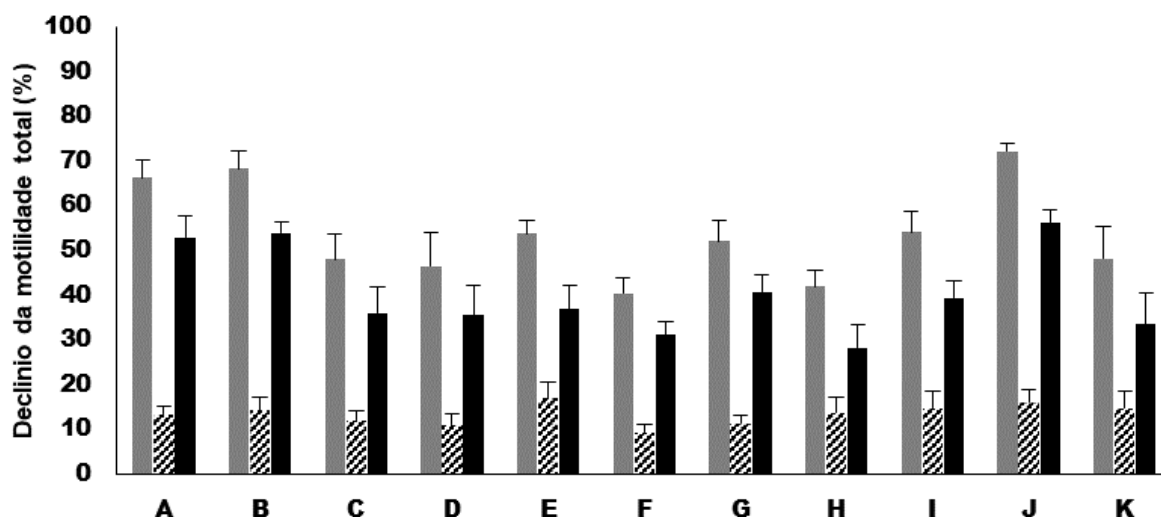


Figura 7. Declínio médio da motilidade total de espermatozoides de búfalos, por animal, no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim do período de incubação pós-descongelamento. Dados apresentados como média e erro-padrão da diferença da motilidade total de 8 a 11 ejaculados para cada animal (A-K). As diferenças foram obtidas entre: (■) avaliação pré-resfriamento (até uma hora após a diluição e imediatamente antes do resfriamento) e 180 minutos após o descongelamento [PR – PD\_T180]; (▨) avaliação pré-resfriamento e 5 minutos após o descongelamento [PR – PD\_T5]; (■) avaliação 5 e 180 minutos após o descongelamento [PD\_T5 – PD\_T180].

### 5.1.3. Variação intra-indivíduo

Para melhor caracterizar a variação na resposta dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento, avaliou-se o declínio da motilidade total por ejaculado para cada animal. Como demonstrado na Figura 8A-C, uma grande variação nesse parâmetro foi observada entre os ejaculados de um mesmo animal no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento (PR – PD\_T180). Foi observado que, enquanto alguns animais apresentaram pequena variação entre seus ejaculados (E e J), outros animais apresentaram variações extremas (C, D, K), de 45% a 75%, entre os ejaculados que exibiram os maiores e os menores valores de declínio da motilidade nesse período de avaliação (Figura 8A). Em relação aos períodos referentes ao congelamento (PR – PD\_T5) e ao pós-descongelamento (PD\_T5 – PD\_T180), a maior variação entre os ejaculados de cada animal foi observada na incubação após o descongelamento (Figura 8B-C).

Foram observados padrões distintos de variação da motilidade total do início do resfriamento ao fim da incubação pós-descongelamento, tanto entre os animais, como entre os ejaculados do mesmo animal. Na Figura 9, esses padrões estão demonstrados a partir dos resultados da motilidade total de cada ejaculado dos animais A-K nos diferentes tempos de avaliação, antes do congelamento e durante a incubação após o descongelamento.

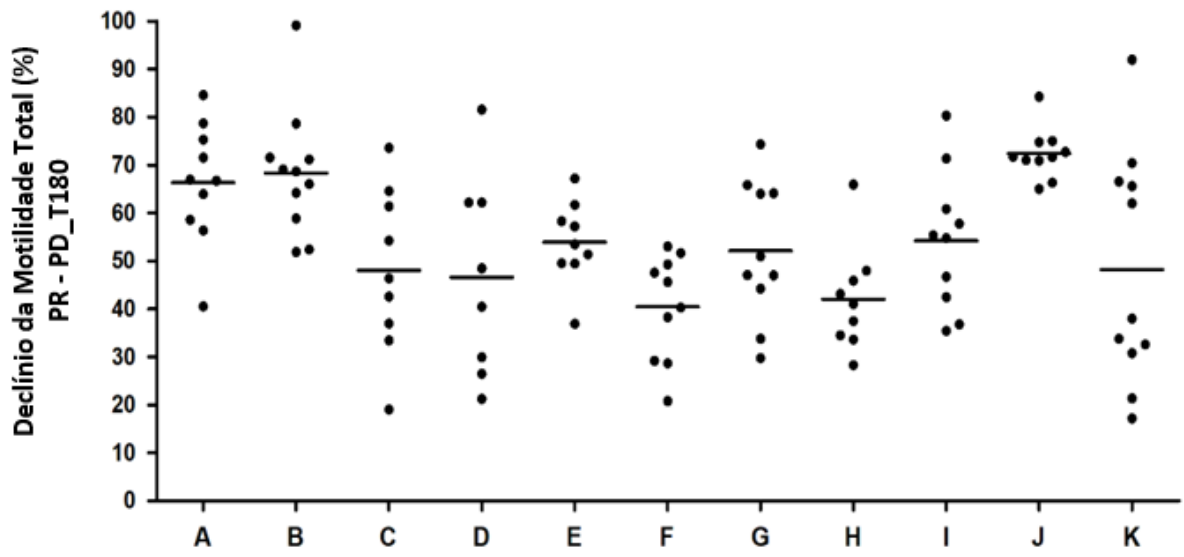
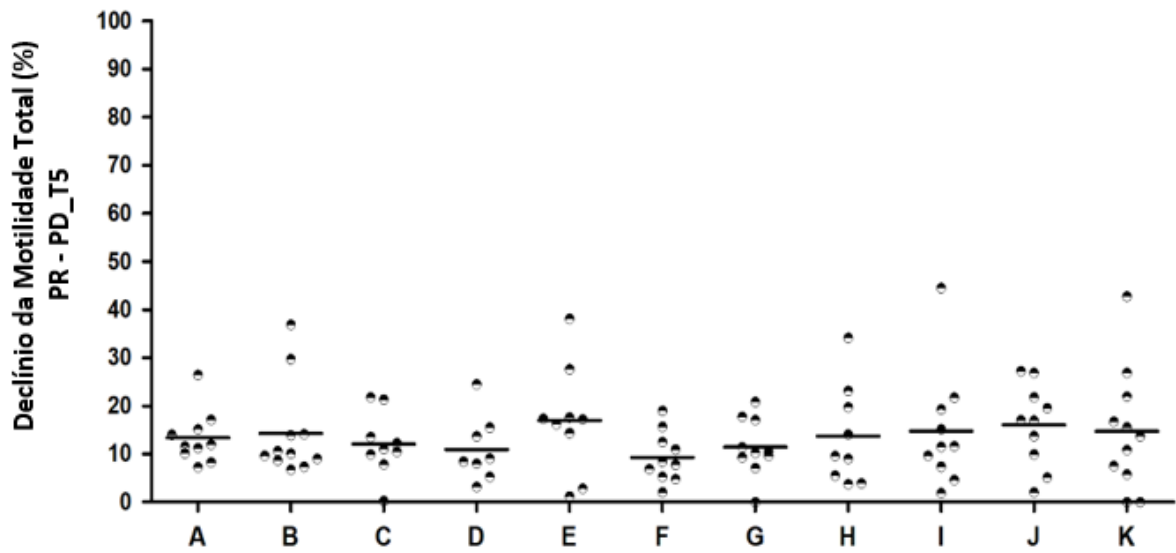
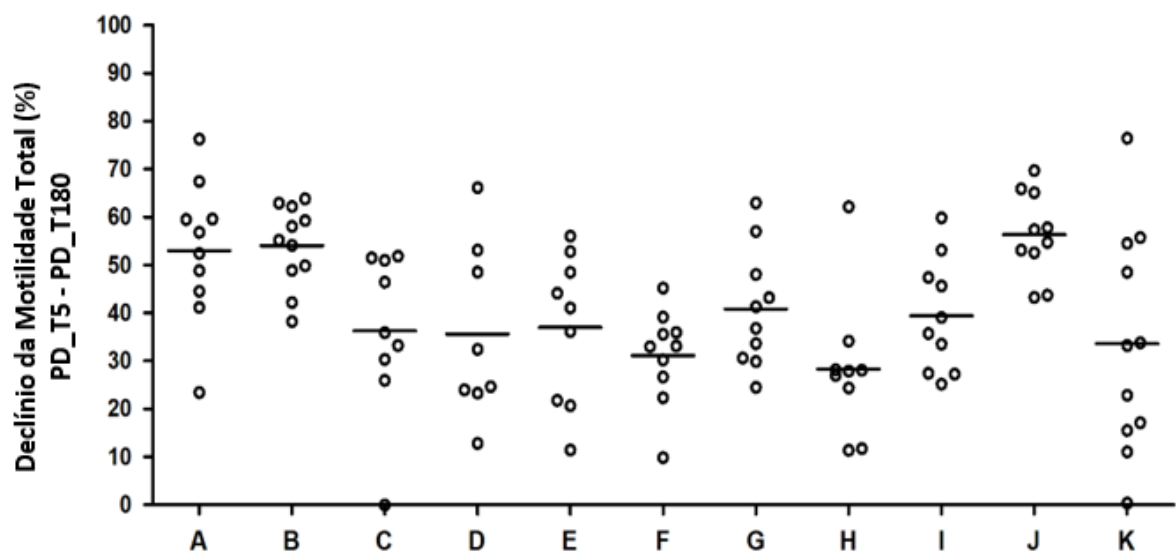
**A****B****C**



Figura 8. Variação intra-indivíduo do declínio da motilidade total na resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. (A) Declínio da motilidade total por ejaculado no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento [PR – PD\_T180]. (B) Declínio da motilidade total por ejaculado no período compreendido entre o início do resfriamento e 5 minutos após o descongelamento [PR – PD\_T5]; (C) Declínio da motilidade total por ejaculado durante a incubação após o descongelamento [PD\_T5 – PD\_T180]. Dados referentes a 8 a 11 ejaculados para cada animal (A-K); linha preta representa a média dos ejaculados por animal.

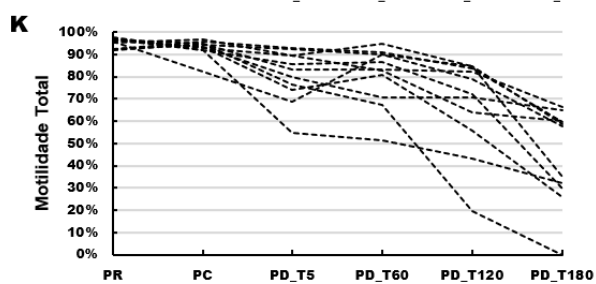
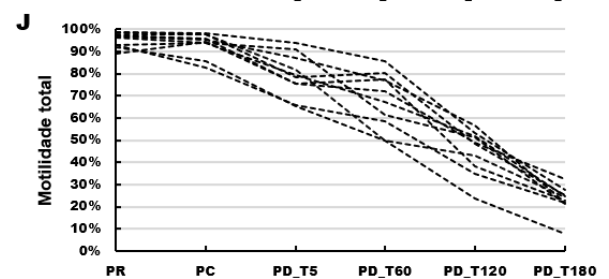
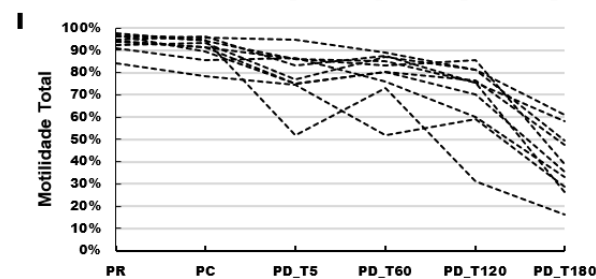
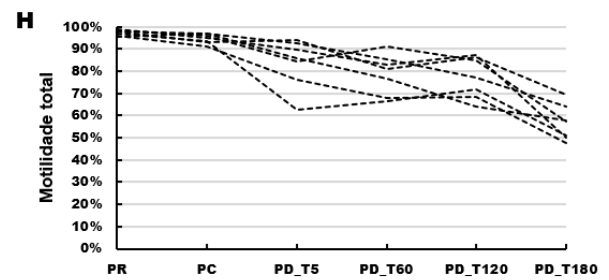
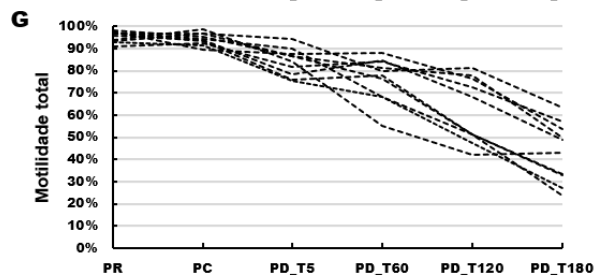
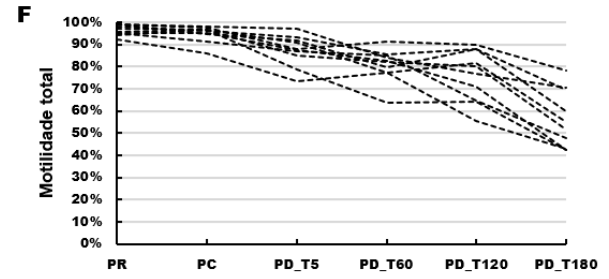
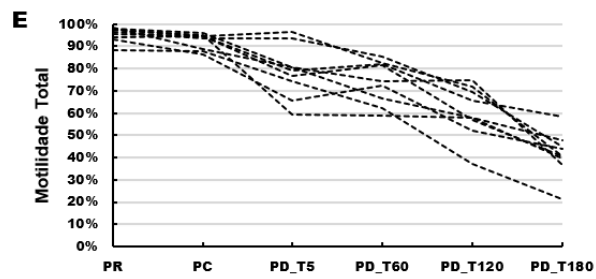
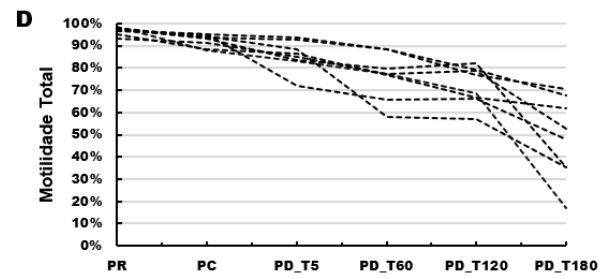
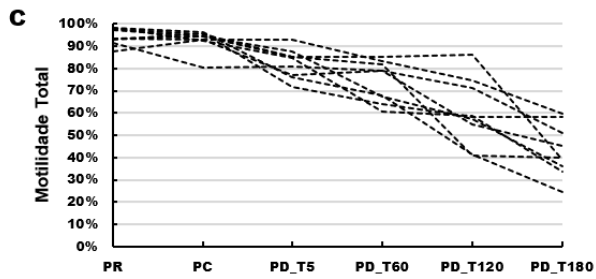
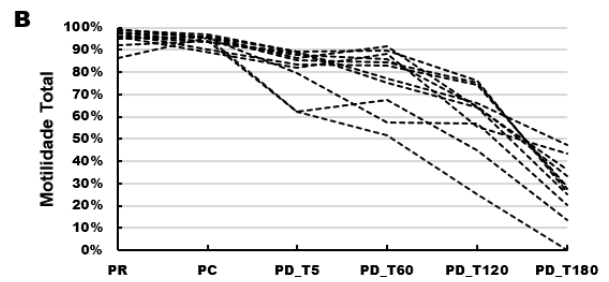
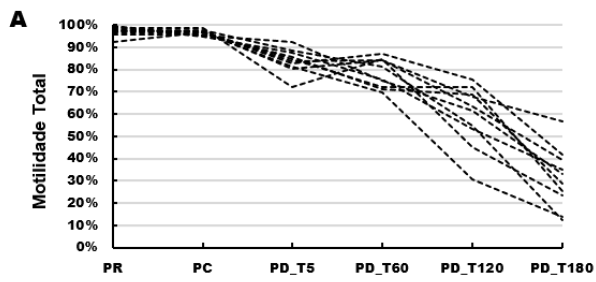


Figura 9. Variação intra-indivíduo da motilidade total na resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. Cada animal é representado por um gráfico (A-K). Cada linha, em cada gráfico, representa um ejaculado. PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD\_T5: 5 minutos pós-descongelamento; PD\_T60: 60 minuto pós-descongelamento; PD\_T120: 120 minutos pós-descongelamento; PD\_T180: 180 minutos pós-descongelamento.

## 5.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EJACULADOS DE BÚFALO (*Bubalus bubalis*) QUE APRESENTAM MAIOR E MENOR RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA AO PROCESSO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO

### 5.2.1. Classificação dos ejaculados de acordo com a resistência espermática ao congelamento-descongelamento

A partir do total de ejaculados obtidos (n=118) de 13 touros, foi possível identificar três categorias de acordo com a porcentagem de células móveis ao final do período de incubação após o descongelamento (Figura 10).

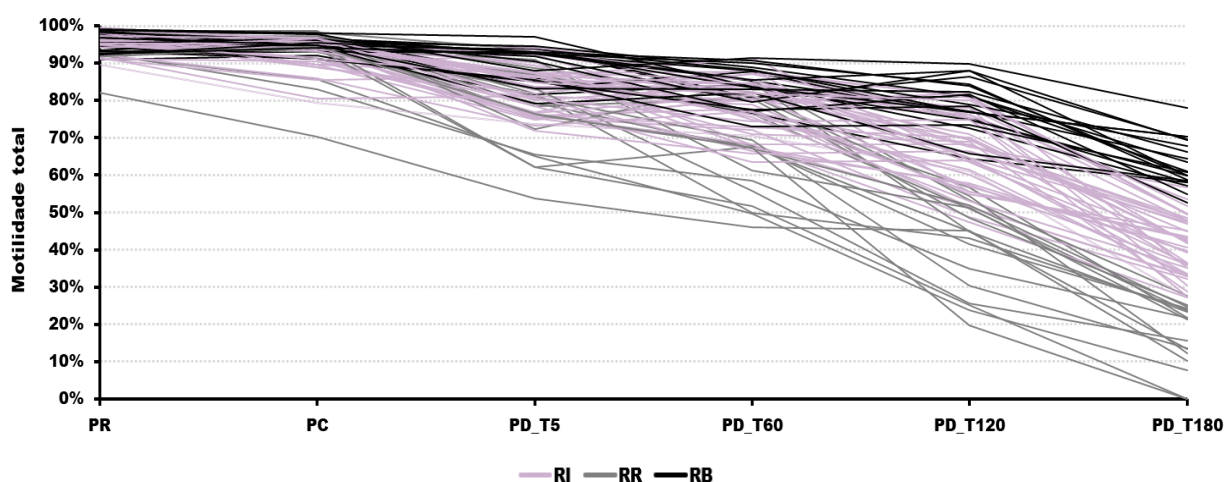


Figura 10. Categorias de ejaculados determinadas a partir da motilidade total ao final do período de incubação após o descongelamento. Dados apresentados individualmente para cada ejaculado. As cores representam as três categorias de resistência espermática ao congelamento-descongelamento. PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD\_T5: 5 minutos pós-descongelamento; PD\_T60: 60 minutos pós-descongelamento; PD\_T120: 120 minutos pós-descongelamento; PD\_T180: 180 minutos pós-descongelamento.

A fim de selecionar os ejaculados que apresentaram a população espermática mais resistente ao congelamento-descongelamento e aqueles cuja população espermática foi menos resistente, utilizou-se como critério para a determinação de cada categoria o declínio da motilidade total no período compreendido entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento ( $\Delta R_{(MT)}$ ). Dessa forma, o  $\Delta R_{(MT)}$  foi calculado a partir da diferença entre a motilidade total avaliada no sêmen diluído imediatamente antes do resfriamento (até uma hora após a diluição) (PR) e 180 minutos após o descongelamento e incubação a 37 °C (PD\_T180), de acordo com a fórmula:  $\Delta R_{(MT)} = PR - PD\_T180$ . Na Tabela 5, estão apresentadas as medidas de posição e de dispersão referentes ao  $\Delta R_{(MT)}$  do total de ejaculados obtidos.

Tabela 5. Medidas de posição e de dispersão do  $\Delta R_{(MT)}$  (declínio da motilidade total entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento)

<i>Parâmetro</i>	(%)
<b>N</b>	118
<b>Média ± desvio-padrão</b>	55,03 ± 17,37
<b>Mínimo – máximo</b>	17,20 – 99,11
<b>Percentil 25</b>	41,10
<b>Percentil 75</b>	68,70

A partir dos percentis 25 e 75 foram definidos os limites inferior e superior de cada categoria, de forma que os ejaculados que apresentaram declínio da motilidade total ( $\Delta R_{(MT)}$ ) no período considerado (PR – PD\_T180) igual ou inferior a 40% (P(25)) foram classificados como de resistência boa (RB); aqueles com  $\Delta R_{(MT)}$  igual ou superior a 70% (P(75)) foram classificados como de resistência ruim (RR); e aqueles com  $\Delta R_{(MT)}$  entre 40% e 70% foram classificados como de resistência intermediária (RI) (Figura 11; Tabela 6). Na Tabela 6, observa-se que o declínio médio da motilidade total do início do resfriamento ao fim da incubação pós-descongelamento foi de 31,1% ± 1,2 para os ejaculados cujos espermatozoides apresentaram maior resistência ao processo (RB), e de 76,5% ± 1,3 para os ejaculados dos quais os espermatozoides foram menos resistentes (RR).

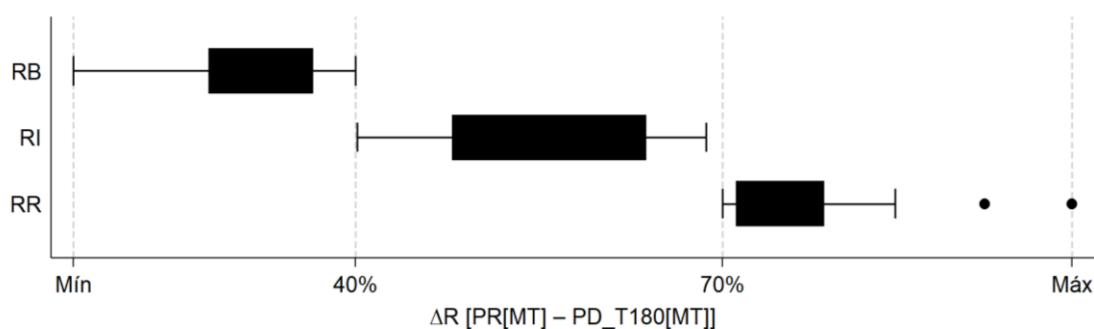


Figura 11. Representação (*boxplot*) das categorias de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. RB: resistência boa; RI: resistência intermediária; RR: resistência ruim.  $\Delta R_{(MT)}$ : declínio da motilidade total entre o momento pré-resfriamento (PR) e 180 minutos pós-descongelamento (PD\_T180). [ $\Delta R_{(MT)} = PR - PD_{T180}$ ].

Tabela 6. Valores de média, erro-padrão, mínimo e máximo do  $\Delta R_{(MT)}$  por categoria de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento

<i>Parâmetro</i>	<i>Categoria</i>		
	<i>RB</i> $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$	<i>RI</i> $40\% < \Delta R_{(MT)} < 70\%$	<i>RR</i> $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$
<b>N</b>	27	63	28
<b>Média ± erro-padrão (%)</b>	31,1 ± 1,2	55,7 ± 1,1	76,5 ± 1,3
<b>Mínimo – máximo (%)</b>	17,2 – 40,4	40,5 – 69,1	70,4 – 99,1

$\Delta R_{(MT)}$ : declínio da motilidade total entre o momento pré-resfriamento e 180 minutos pós-descongelamento [ $\Delta R_{(MT)} = PR - PD_{T180}$ ]; RB: resistência boa; RI: resistência intermediária; RR: resistência ruim.

Com o intuito de avaliar as diferenças entre os ejaculados que apresentaram espermatozoides de maior e menor resistência ao processo de congelamento-descongelamento, foram excluídos do estudo, os ejaculados classificados como de resistência espermática intermediária (RI). Além disso, foram também eliminados os ejaculados que apresentaram grande variação na motilidade total ao longo do período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento, aumentando-se, dessa forma, a homogeneidade entre as observações de cada grupo, principalmente no que se refere à longevidade dos espermatozoides após o descongelamento. Assim, foi obtido um total de 40 ejaculados distribuídos em dois grupos de acordo com a resistência espermática ao processo congelamento-descongelamento: RB – resistência boa (n = 21) e RR – resistência ruim (n = 19) (Figura 12).

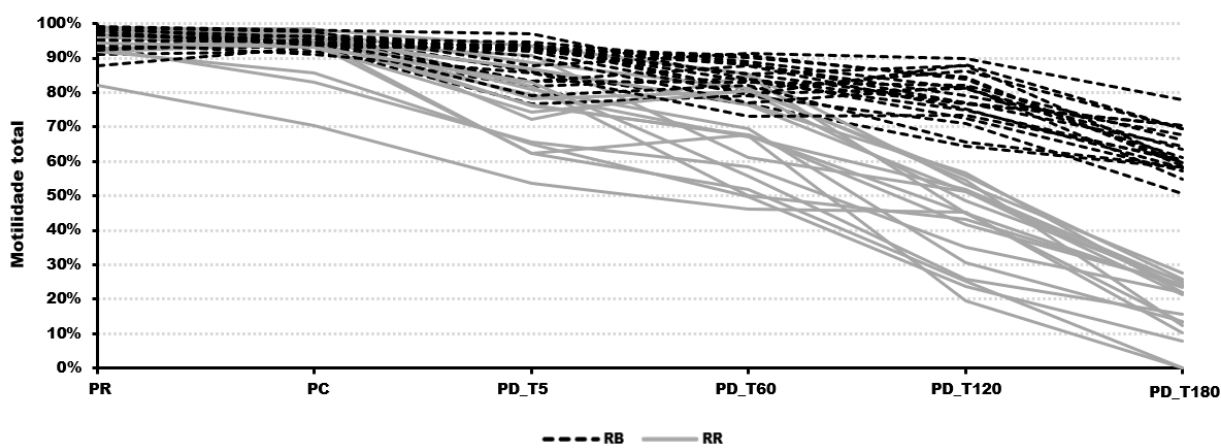


Figura 12. Motilidade total em ejaculados RB e RR no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento. Dados apresentados individualmente para cada ejaculado dos grupos de resistência espermática boa (RB –  $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$ ; n=21) e ruim (RR –  $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$ , n=19). PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD\_T5: 5 minutos pós-descongelamento; PD\_T60: 60 minutos pós-descongelamento; PD\_T120: 120 minutos pós-descongelamento; PD\_T180: 180 minutos pós-descongelamento. [ $\Delta R_{(MT)} = PR - PD_{T180}$ ].

### 5.2.2. Caracterização dos grupos de ejaculados classificados como sendo de resistência espermática boa e ruim ao congelamento-descongelamento

O grupo RB compreendeu os 21 ejaculados (18% - 21/118) cujos espermatozoides apresentaram o menor declínio da motilidade total no período compreendido entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento. Em média, no grupo RB, foi observado um declínio de aproximadamente 33% da motilidade total, com variação total entre 21% a 40%. Por sua vez, o grupo RR foi composto pelos 19 ejaculados (16% - 19/118) que apresentaram os espermatozoides com menor resistência ao processo de congelamento-descongelamento, representada pelo maior declínio da motilidade total, sendo esse de aproximadamente 77%, o qual variou entre 70% a 99% (Tabela 7; Figura 13).

Tabela 7. Valores de média, erro-padrão, mínimo e máximo do declínio médio da motilidade total de espermatozoides de búfalos submetidos ao processo congelamento-descongelamento

Parâmetro	$\Delta R_{(MT)}$	
	RB ( $\Delta R \leq 40\%$ )	RR ( $\Delta R \geq 70\%$ )
N	21	19
Média $\pm$ erro-padrão (%)	32,8 $\pm$ 1,0	77,4 $\pm$ 1,8
Mínimo – máximo (%)	20,8 – 40,4	70,4 – 99,1

RB e RR: grupo de ejaculados com resistência boa e ruim, respectivamente, ao processo de congelamento-descongelamento de espermatozoides.  $\Delta R_{(MT)}$ : declínio da motilidade total entre o momento pré-resfriamento (PR) e 180 minutos pós-descongelamento [ $\Delta R_{(MT)} = PR - PD_{T180}$ ].

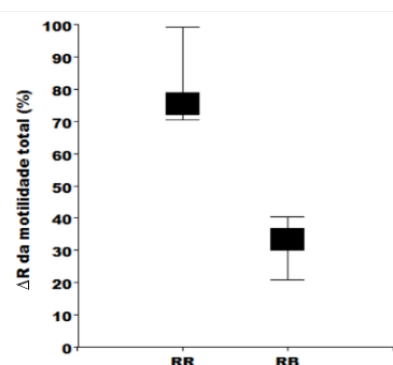


Figura 13. Boxplot do declínio da motilidade total ( $\Delta R_{(MT)}$ ) em ejaculados RB e RR.

A fim de avaliar a composição dos grupos RB e RR em relação à contribuição de cada touro, de forma a minimizar a influência do fator animal, foram analisados o número de animais e de ejaculados em cada grupo, assim como a relação animal/ejaculado. Além disso, foi avaliada, entre os grupos, a proporção de touros que tiveram seus ejaculados classificados como exclusivamente de resistência espermática boa ou ruim, e daqueles que apresentaram ejaculados de ambas as categorias. Como demonstrado na Tabela 8, tanto os ejaculados como os animais foram distribuídos numericamente de forma homogênea entre os grupos RB e RR. No grupo RB, o número de ejaculados correspondeu a nove animais, variando de um a cinco ejaculados/animal, enquanto o grupo RR foi composto por oito animais, com variação de 1-8 ejaculados/animal.

A homogeneidade entre os grupos se manteve quando esses foram comparados quanto à proporção de touros que apresentaram ejaculados classificados como RB somente, RR somente ou RB e RR. Dos 13 touros utilizados para o estudo, cinco (RB) e quatro (RR) apresentaram ejaculados pertencentes a um único grupo experimental, totalizando 13 e 14 ejaculados nos grupos RB e RR, respectivamente. O restante dos animais ( $n = 4$ ) foi alocado em ambos os grupos, por apresentarem ejaculados tanto de resistência boa ( $n = 8$ ) quanto ruim ( $n = 5$ ) ao congelamento de espermatozoides.

Tabela 8. Caracterização numérica de ejaculados e animais dos grupos de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento

	Grupo	
	RB ( $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$ )	RR ( $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$ )
Número total de ejaculados	21	19
Número total de animais <sup>1</sup>	9 (21)	8 (19)
Número de ejaculados/animal	1-5	1-8
Nº de animais exclusivos do grupo <sup>2</sup>	5 (13)	4 (14)
Nº de animais presentes em ambos os grupos <sup>3</sup>	4 (8)	4 (5)

Dados apresentados em número absoluto.  $\Delta R_{(MT)}$ : declínio da motilidade total entre o momento pré-resfriamento (PR) e 180 minutos pós-descongelamento [ $\Delta R_{(MT)} = PR - PD_{T180}$ ]; RB: resistência boa; RR: resistência ruim. <sup>1</sup>Número total de animais que apresentaram ejaculados em cada grupo, em um total de 13 touros utilizados para o estudo. <sup>2,3</sup>Número de animais que apresentaram ejaculados classificados somente em um grupo e em ambos os grupos, respectivamente. Os valores entre parênteses ( ) representam o número de ejaculados obtidos a partir do respectivo número de animais.

### 5.2.3. Características espermáticas e seminais pré-congelamento de ejaculados RB e RR

Para avaliar a qualidade dos ejaculados RB e RR antes do processo de congelamento, os grupos foram comparados quanto às características do sêmen *in natura* (Tabela 9).

Observou-se que ambos os grupos apresentaram ejaculados com qualidade espermática semelhante, no que se refere às porcentagens de espermatozoides móveis, morfologicamente normais e com membrana plasmática funcionalmente ativa (células reativas ao teste hiposmótico). No entanto, a mesma semelhança não foi observada na composição do sêmen, visto que o grupo de melhor resistência ao congelamento (RB) apresentou menor volume de sêmen e maior concentração espermática, em comparação ao grupo de resistência ruim (RR). Por sua vez, o número total de espermatozoides foi semelhante entre os grupos.

Tabela 9. Parâmetros seminais dos ejaculados de búfalos classificados como de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento

Parâmetros seminais	Grupos	
	RB (n=21)	RR (n=19)
Volume	1,95 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,86 ± 0,32 <sup>a</sup>
Motilidade total subjetiva (%)	87,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	87,1 ± 1,9 <sup>a</sup>
Concentração espermática (x10 <sup>6</sup> sptz/ml)	1201,2 ± 111,7 <sup>a</sup>	895,8 ± 105,1 <sup>b</sup>
Número total de espermatozoides/ejaculado (x 10 <sup>9</sup> )	2402,0 ± 378,5 <sup>a</sup>	2693,3 ± 452,5 <sup>a</sup>
Espermatozoides morfologicamente normais (%)	78,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	78,7 ± 1,1 <sup>a</sup>
Células reativas ao teste hiposmótico (%)	*79,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	75,5 ± 1,9 <sup>a</sup>

Dados apresentados como média ± erro-padrão. Letras distintas na linha indicam diferença significativa entre os grupos, para cada variável ( $p \leq 0,05$ ). (\*) RB: n=20.

Diferenças significativas entre os grupos RB e RR também foram observadas no volume de sêmen, assim como na proporção sêmen/diluidor, necessários para se alcançar a concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides totais/ml. Como demonstrado na Tabela 10, para a diluição dos ejaculados que apresentaram menor resistência ao congelamento-descongelamento (RR), em comparação àqueles do grupo RB, foi necessário volume significativamente maior de sêmen para quantidades semelhantes de diluidor. Essa diferença na proporção volume de sêmen:volume de diluidor influenciou o fator de diluição, que foi significativamente maior no grupo RR.

Tabela 10. Relação entre volume de sêmen e diluidor para diluição dos ejaculados RB e RR para o congelamento

Grupo	N	Volume de sêmen	Volume de diluidor	Relação sêmen/diluidor	Fator de diluição
RB	21	155 ± 19 <sup>a</sup>	2845 ± 19 <sup>a</sup>	0,0554 ± 0,0072 <sup>a</sup>	1/18
RR	19	229 ± 34 <sup>b</sup>	2771 ± 34 <sup>a</sup>	0,0856 ± 0,0143 <sup>b</sup>	1/12

RB e RR: grupos de resistência boa e ruim, respectivamente, ao processo de congelamento-descongelamento de espermatozoides. Dados apresentados como média ± erro padrão. Letras distintas na coluna indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).



#### 5.2.4. Avaliação da sobrevivência e longevidade espermáticas em ejaculados RB e RR antes e após o processo de congelamento-descongelamento

Os grupos RB e RR foram similares quanto à média da motilidade total no sêmen diluído tanto imediatamente antes (PR) quanto após o resfriamento (PC). No entanto, observa-se que após o descongelamento, a motilidade total passa a diferir significativamente entre os grupos, sendo essa diferença cada vez mais evidente ao longo do tempo de incubação após o descongelamento (5 a 180 minutos) (Figura 14; Tabela 11). Na Tabela 11, observa-se que em ambos os grupos ocorreram reduções significativas da motilidade total após o descongelamento. No entanto, em contraste ao grupo RB, no qual a motilidade total foi semelhante entre o sêmen diluído imediatamente antes (PR) e após o resfriamento (PC), no grupo RR, reduções significativas desse parâmetro passaram a ser observadas a partir do momento PC.

Tabela 11. Média e erro-padrão da motilidade total (%) dos espermatozoides de búfalos, por momento de avaliação no CASA, nos grupos de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento

<i>Tempo</i>	<i>Motilidade total (%)</i>	
	<i>RB (n=21)</i>	<i>RR (n=19)</i>
<b>PR</b>	95,5 ± 0,6 <sup>Aa</sup>	95,1 ± 1,0 <sup>Aa</sup>
<b>PC</b>	95,0 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	93,2 ± 1,6 <sup>Ba</sup>
<b>PD_T5</b>	89,3 ± 1,2 <sup>Ba</sup>	76,8 ± 2,5 <sup>Cb</sup>
<b>PD_T60</b>	83,8 ± 1,1 <sup>Ca</sup>	67,3 ± 2,9 <sup>Db</sup>
<b>PD_T120</b>	78,8 ± 1,5 <sup>Da</sup>	42,3 ± 2,8 <sup>Eb</sup>
<b>PD_T180</b>	62,7 ± 1,4 <sup>Ea</sup>	17,7 ± 2,0 <sup>Fb</sup>

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna (A-F) e minúsculas na linha (a,b), diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ).

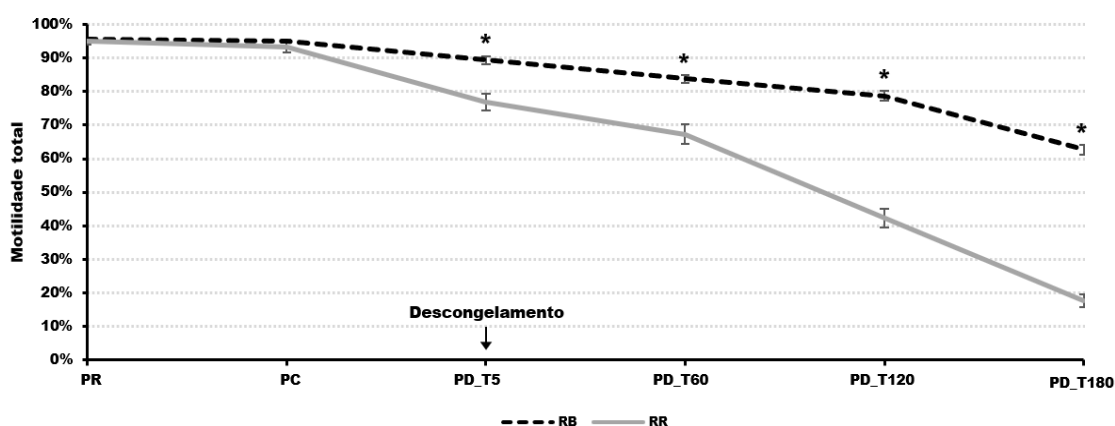


Figura 14. Motilidade total média em ejaculados RB e RR ao longo do período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento. Dados apresentados como a média por grupo para cada momento de avaliação. (\*) indica diferença significativa entre os grupos para cada tempo ( $p \leq 0,05$ ). RB e RR: grupos de resistência espermática boa ( $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$ ,  $n=21$ ) e ruim ( $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$ ,  $n=19$ ), respectivamente. PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD\_T5: 5 minutos pós-descongelamento; PD\_T60: 60 minutos pós-descongelamento; PD\_T120: 120 minutos pós-descongelamento; PD\_T180: 180 minutos pós-descongelamento. [ $\Delta R_{(MT)} = PR - PD_{T180}$ ].

No presente estudo, a resistência dos espermatozoides ao congelamento-descongelamento foi determinada a partir do declínio da motilidade total do início do resfriamento ao fim da incubação pós-descongelamento, fornecendo subsídios para a avaliação da porcentagem de espermatozoides que se mantiveram móveis 180 minutos após o descongelamento. Entretanto, com o intuito de comparar os ejaculados RB e RR quanto à sobrevivência espermática ao congelamento e à longevidade dos espermatozoides após o descongelamento, avaliou-se o declínio da motilidade total em cada uma dessas etapas. Os resultados referentes à essa avaliação estão apresentados na Figura 15 e na Tabela 12.

Tabela 12. Média e erro-padrão do declínio da motilidade total (%) dos espermatozoides de búfalos entre os tempos de avaliação antes e após o congelamento-descongelamento, em ejaculados RB e RR

	<i>Motilidade total (%)</i>	
	<i>RB (n=21)</i>	<i>RR (n=19)</i>
$\Delta 1_{(MT)} (PR-PC)$	1,33 ± 0,34 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,78 <sup>a</sup>
$\Delta 2_{(MT)} (PC-PD_{T5})$	5,72 ± 1,16 <sup>a</sup>	16,44 ± 1,88 <sup>b</sup>
$\Delta 3_{(MT)} (PD_{T5} - PD_{T180})$	26,61 ± 1,36 <sup>a</sup>	59,04 ± 2,34 <sup>b</sup>
$\Delta 4_{(MT)} (PR - PD_{T5})$	6,21 ± 1,05 <sup>a</sup>	18,31 ± 2,15 <sup>b</sup>

Motilidade total avaliada no CASA. <sup>a,b</sup>Valores seguidos por letras distintas na linha diferem significativamente ( $p \leq 0,001$ ).

$\Delta 1_{(MT)}$ : MT pré-resfriamento – MT pré-congelamento (pós-resfriamento);

$\Delta 2_{(MT)}$ : MT pré-congelamento – MT 5 minutos pós-descongelamento;

$\Delta 3_{(MT)}$ : MT 5 minutos – MT 180 minutos pós-descongelamento;

$\Delta 4_{(MT)}$ : MT pré-resfriamento – MT 5 minutos pós-descongelamento.

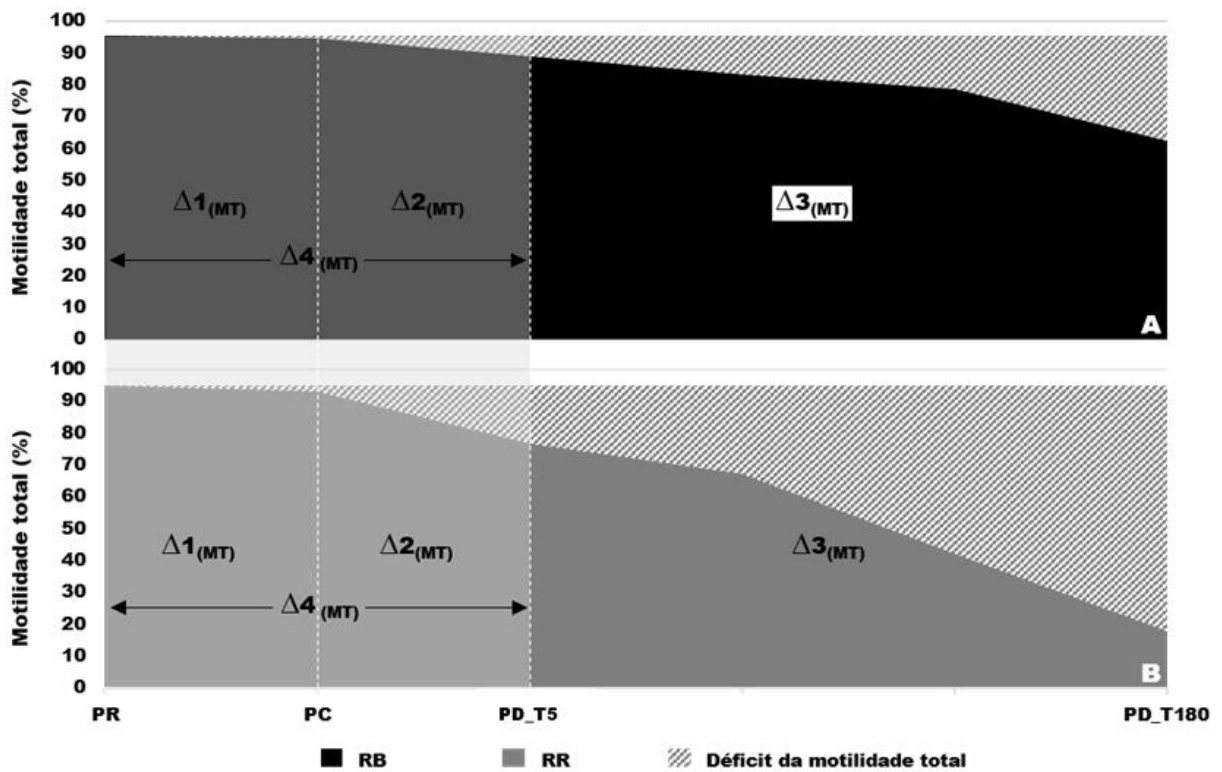


Figura 15. Declínio médio da motilidade total (%) em ejaculados RB e RR no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento. (A) RB: grupo de resistência espermática boa ( $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$ ,  $n=21$ ) e (B) RR: grupo de resistência espermática ruim ( $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$ ,  $n=19$ ). A área sólida corresponde à motilidade total (%), avaliada no CASA. A área tracejada corresponde ao declínio da motilidade total (%) em relação à avaliação pré-resfriamento (motilidade total inicial). PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD\_T5: 5 minutos pós-descongelamento; PD\_T180: 180 minutos pós-descongelamento.  $\Delta$ : diferença da motilidade total (%) em cada etapa do processo congelamento-descongelamento.  $\Delta 1_{(MT)}$ : PR – PC;  $\Delta 2_{(MT)}$ : PC – PD\_T5;  $\Delta 3_{(MT)}$ : PD\_T5 – PD\_T180;  $\Delta 4_{(MT)}$ : PR – PD\_T5.

Os grupos RB e RR apresentaram reduções semelhantes da motilidade total após o resfriamento ( $\Delta 1_{(MT)}$ ), ou seja, entre as avaliações realizadas no sêmen diluído imediatamente antes do resfriamento (PR) e imediatamente antes do congelamento (PC). Nas etapas correspondentes ao congelamento ( $\Delta 2_{(MT)}$ ) e ao período de incubação pós-descongelamento ( $\Delta 3_{(MT)}$ ), o grupo RR apresentou maior declínio da motilidade total, em comparação ao grupo RB ( $p \leq 0,001$ ). Possivelmente devido à diferença nesse parâmetro observada na etapa de congelamento ( $\Delta 2_{(MT)}$ ), o grupo RR também apresentou maior queda da motilidade total entre a avaliação pré-resfriamento e aquela imediatamente após o descongelamento ( $\Delta 4_{(MT)}$ ) ( $p \leq 0,001$ ).

#### 5.2.5. Avaliação da cinética espermática em ejaculados RB e RR antes e após o processo de congelamento-descongelamento

Em relação à qualidade do movimento espermático, os espermatozoides dos ejaculados RB apresentaram maior velocidade (VCL, VSL e VAP) que os ejaculados RR em todas as avaliações, exceto para os parâmetros VSL e VAP na avaliação pré-resfriamento, os quais foram similares entre os grupos. Após o descongelamento, de 5 a 180 minutos, o grupo RB, em comparação ao RR, apresentou maior porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo (PROG) e de células rápidas (Figura 16).

Para os demais parâmetros de cinética espermática, Linearidade, STR e BCF, os grupos RB e RR foram similares nas avaliações pré-resfriamento, pré-congelamento e até 60 minutos pós-descongelamento. Diferenças significativas entre os grupos nesses parâmetros foram observadas apenas após 120 minutos pós-descongelamento, para Linearidade e BCF, e após 180 minutos pós-descongelamento, para STR, sendo os maiores valores apresentados pelo grupo RB. Para o ALH, o grupo RB apresentou valores significativamente maiores que o grupo RR em alguns momentos de avaliação, como nos tempos pré-resfriamento e 5, 120 e 180 minutos após o descongelamento. Nas avaliações restantes, não foram observadas diferenças significativas (Figura 16).

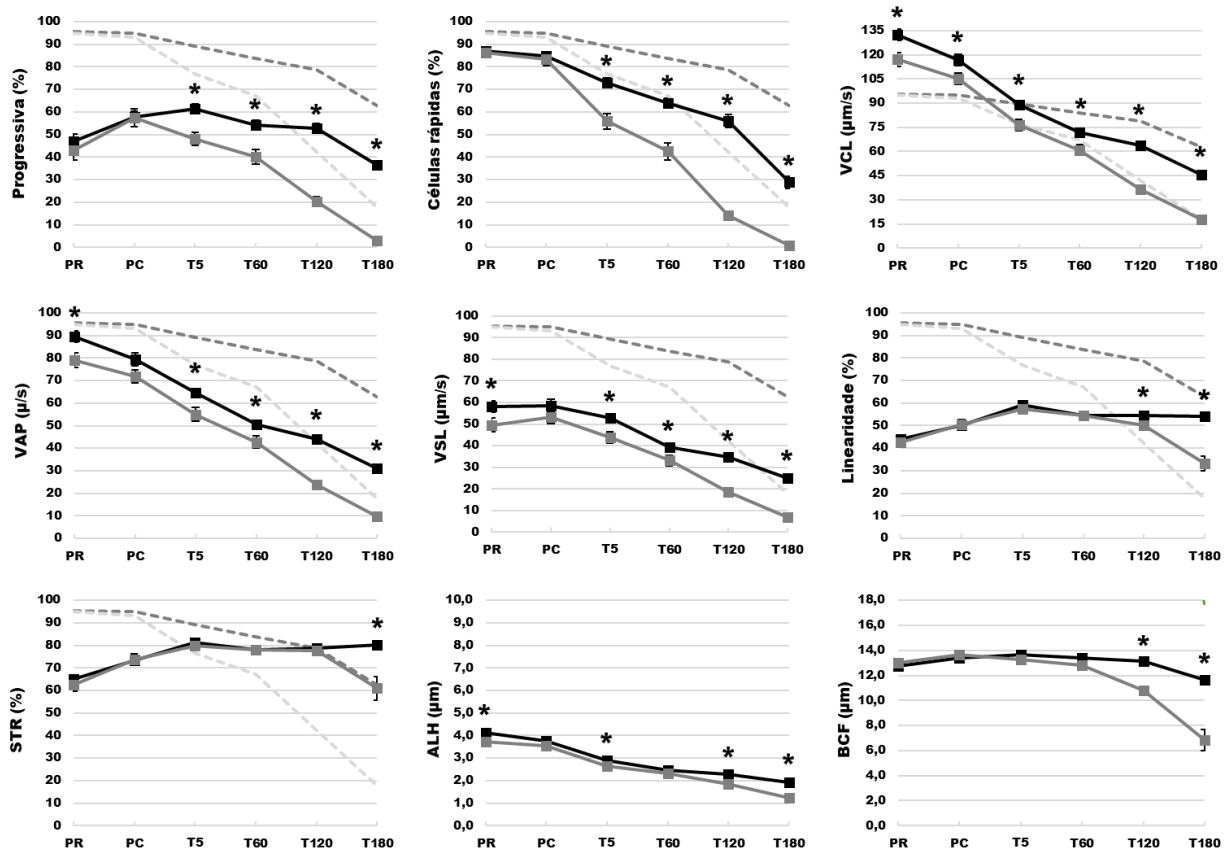


Figura 16. Parâmetros da cinética espermática, avaliados no CASA, no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento, entre ejaculados de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR). RB: linha preta; RR: linha cinza. (\*) indica diferença significativa entre os grupos RB e RR para cada momento de avaliação ( $p \leq 0,05$ ). As linhas tracejadas representam a motilidade total para os grupos RB (linha escura) e RR (linha clara). VCL: velocidade curvilinear; VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear; STR: retilinearidade; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência do batimento do flagelo; PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; T5, T60, T120, T180: 5, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento.

### 5.3. ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL

Com o objetivo de avaliar as diferenças no perfil proteômico do plasma seminal possivelmente relacionadas à resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento, dos grupos RB

(n=21) e RR (n=19), foram selecionados um a dois ejaculados de um total de nove touros. Dessa forma, foram constituídos dois grupos: RBp\_ejaculados de resistência espermática boa (n=9) e RRp\_ejaculados de resistência espermática ruim (n=8). A partir dessa seleção, foi possível subdividir esses dois grupos, formando três subgrupos experimentais: RBp<sub>sub</sub> (6 ejaculados / 3 animais) e RRp<sub>sub</sub> (5 ejaculados / 3 animais), compostos por amostras pertencentes a animais que tiveram seus ejaculados exclusivamente classificados como de resistência boa ou ruim, respectivamente; e o subgrupo RBp/RRp<sub>sub</sub> (6 ejaculados / 3 animais), formado por amostras pertencentes a animais que apresentaram ejaculados classificados como de resistência espermática boa e ruim. Nesse último subgrupo, cada animal contribuiu com um ejaculado de cada classificação.

### 5.3.1. Caracterização dos grupos de ejaculados RBp e RRp quanto às características do sêmen *in natura* e à sobrevivência espermática ao congelamento e longevidade após o descongelamento

A fim de certificar que os novos grupos RBp e RRp foram compostos por ejaculados de mesma qualidade espermática e seminal inicial, aqueles foram comparados quanto às características do sêmen *in natura*. Os parâmetros avaliados estão apresentados na Tabela 13, a partir da qual é possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das características analisadas. Também foi possível verificar que foram utilizadas proporções similares de sêmen e meio diluidor para a diluição dos ejaculados RB e RR para o congelamento, como demonstrado pela ausência de diferença significativa no fator de diluição (Tabela 13).

Tabela 13. Características espermáticas e seminais, *in natura*, dos ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento

	Grupos	
	RBp (n=9)	RRp (n=8)
<b>Volume</b>	2,08 ± 0,28 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,53 <sup>a</sup>
<b>Motilidade total subjetiva (%)</b>	88,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	83,1 ± 2,7 <sup>a</sup>
<b>Concentração espermática (x10<sup>6</sup> spz/ml)</b>	1180,6 ± 193,3 <sup>a</sup>	1155,6 ± 137,4 <sup>a</sup>
<b>Número total de espermatozoides/ejaculado (x 10<sup>9</sup>)</b>	2321,8 ± 487,8 <sup>a</sup>	3800,1 ± 753,9 <sup>a</sup>
<b>Espermatozoides morfologicamente normais (%)</b>	76,8 ± 1,32 <sup>a</sup>	77,6 ± 1,98 <sup>a</sup>
<b>Células reativas ao teste hiposmótico (%)</b>	78,3 ± 2,7 <sup>a</sup>	70,6 ± 2,8 <sup>a</sup>
<b>Fator de diluição</b>	1/16 <sup>a</sup>	1/18 <sup>a</sup>

Dados apresentados como média ± erro padrão. Letras distintas na linha indicam diferença significativa entre os grupos, para cada variável ( $p \leq 0,05$ ). RBp e RRp: grupos de resistência espermática boa ( $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$ ) e ruim ( $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$ ), respectivamente.

Para caracterizar os grupos RBp (n=9) e RRp (n=8) formados pelos ejaculados selecionados para a análise proteômica, foram avaliadas a motilidade total individual e média por grupo no período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento (Figura 17). Além disso, os novos grupos RBp e RRp formados foram comparados quanto à sobrevivência espermática ao congelamento, representada pela diferença entre a motilidade total antes e após o congelamento; e quanto à longevidade dos espermatozoides após o descongelamento, representada pela diferença entre a motilidade total 5 e 180 minutos pós-descongelamento (Tabela 14).

Na Figura 17, observa-se que a proporção de células móveis se manteve similar entre os grupos até o congelamento (momentos PR e PC), intervalo no qual foi possível observar que os valores da motilidade total, tanto individuais ( $RB_p$  – linha cinza tracejada,  $n = 9$ ;  $RR_p$ : linha cinza sólida,  $n = 8$ ) quanto médios de cada grupo (linha preta sólida), se encontravam próximos. No entanto, após o descongelamento ( $PD_{T5}$ ), observa-se que os grupos se separam de forma evidente, sendo essa diferença ainda mais acentuada ao longo do tempo, se tornando extrema aos 180 minutos. Ao final do período de incubação pós-descongelamento ( $PD_{180}$ ), enquanto o grupo  $RB_p$  apresenta uma pequena queda dos valores percentuais de motilidade total, em relação à avaliação pré-resfriamento, um grande declínio desse parâmetro é observado no grupo  $RR_p$ . Uma exceção a essas observações está presente no grupo  $RR_p$ , no qual um dos ejaculados apresenta motilidade espermática total mais próxima do grupo  $RB_p$  até 60 minutos após o descongelamento, momento após o qual um grande declínio da motilidade total desse ejaculado é observado.

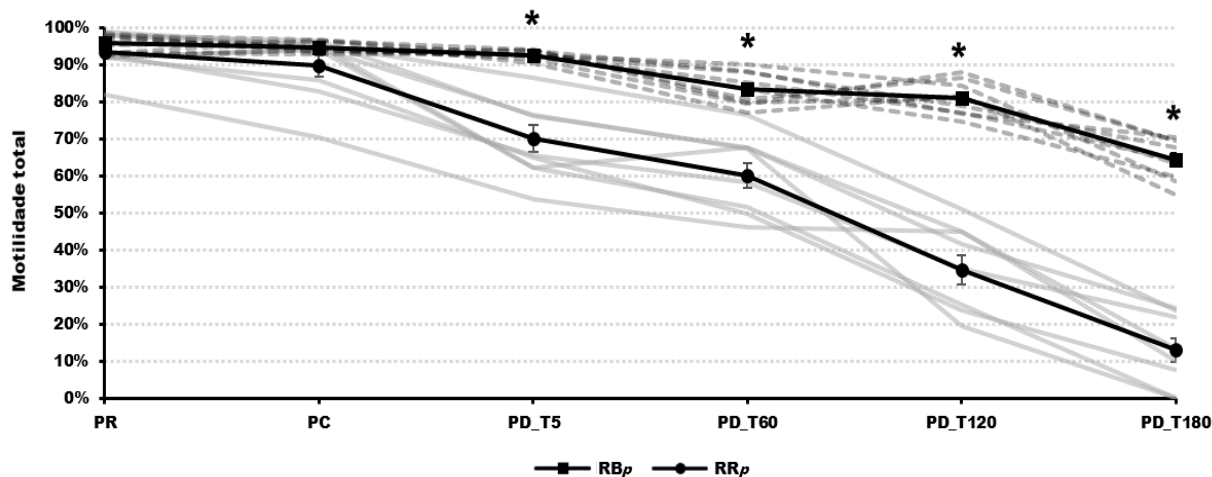


Figura 17. Motilidade total individual e média por grupo, em ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento. Dados apresentados como valores individuais por ejaculado (linhas em cinza – tracejada:  $RB$ ; sólida:  $RR$ ) e médios por grupo  $RB_p$  e  $RR_p$  (linhas pretas) para cada momento do processo congelamento-descongelamento.  $RB_p$  e  $RR_p$ : grupos de resistência espermática boa ( $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$ ,  $n=9$ ) e ruim ( $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$ ,  $n=8$ ), respectivamente. PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento;  $PD_{T5}$ : 5 minutos pós-descongelamento;  $PD_{T60}$ : 60 minutos pós-descongelamento;  $PD_{T120}$ : 120 minutos pós-descongelamento;  $PD_{T180}$ : 180 minutos pós-descongelamento. (\*) indica diferença significativa entre os grupos para cada momento de avaliação ( $p \leq 0,05$ ).

Essas diferenças, entre os grupos, na porcentagem de espermatozoides móveis após o processo de congelamento-descongelamento também foram observadas quando se avaliou o declínio da motilidade total entre as avaliações pré-resfriamento e no tempo 5 após o descongelamento, ( $\Delta C_{(MT)}$ ); e durante a incubação após o descongelamento (diferença entre a motilidade total no tempo 5 e 180 minutos após o descongelamento –  $\Delta D_{(MT)}$ ). Como mostrado na Tabela 14, o grupo  $RB_p$  apresentou menores valores de declínio da motilidade total nos dois períodos avaliados, quando comparado ao grupo  $RR_p$ . Como esperado, devido ao critério utilizado para a classificação dos ejaculados, os grupos também diferiram significativamente no  $\Delta R_{(MT)}$ .

Tabela 14. Média e erro-padrão do declínio da motilidade total (%) dos espermatozoides de búfalos, avaliados no CASA, após o congelamento e o período de incubação pós-descongelamento, em ejaculados RB e RR

	<i>Motilidade total (%)</i>	
	<i>RBp (n=9)</i>	<i>RRp (n=8)</i>
$\Delta R_{(MT)} (PR - PD_{T180})$	$31,7 \pm 1,38^a$	$80,6 \pm 3,65^b$
$\Delta C_{(MT)} (PR - PD_{T5})$	$3,33 \pm 0,88^a$	$24,73 \pm 2,89^b$
$\Delta D_{(MT)} (PD_{T5} - PD_{T180})$	$28,46 \pm 1,68^a$	$55,87 \pm 3,97^b$

Dados apresentados como média  $\pm$  erro-padrão. <sup>a,b</sup> Valores seguidos por letras distintas na linha diferem significativamente ( $p \leq 0,001$ ).  $\Delta R_{(MT)}$ : Motilidade total pré-resfriamento – 180 minutos pós-descongelamento;  $\Delta C_{(MT)}$ : Motilidade total pré-resfriamento – 5 minutos pós-descongelamento;  $\Delta D_{(MT)}$ : Motilidade total 5 minutos – 180 minutos pós-descongelamento.

### 5.3.2. Avaliação da qualidade das amostras de plasma seminal dos ejaculados de resistência espermática boa (RBp) e ruim (RRp), selecionados para análise proteômica

Quando avaliadas quanto à quantidade e qualidade das proteínas, todas as amostras de plasma seminal apresentaram boa concentração proteica (9,6 – 30,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), determinada pelo método de Bradford e ausência de degradação proteolítica detectável pela SDS-PAGE (Figura 18).

A concentração de proteínas no plasma seminal variou de 9,6 – 26,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  no grupo RBp e de 12,5 – 30,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  no grupo RRp. Dentro desses grupos, a partir da distribuição dos ejaculados entre os valores máximo e mínimo, não foi observada uma tendência entre os subgrupos (RBp<sub>sub</sub>, RBp/RRp<sub>sub</sub> e RRp<sub>sub</sub>) em apresentar valores mais altos ou mais baixos de concentração proteica do plasma seminal. Assim, por essa variável, não foi possível diferenciar os ejaculados pertencentes a animais que tiveram seus ejaculados exclusivamente classificados como de resistência boa (subgrupo RBp<sub>sub</sub> – círculo preto) e ruim (subgrupo RRp<sub>sub</sub> – quadrado preto) daqueles animais que tiveram ejaculados classificados tanto como de resistência boa quanto ruim (subgrupo RBp/RRp<sub>sub</sub> – símbolos preto e branco) (Figura 18B).

A partir da análise de correlação de Pearson, a concentração de proteínas do plasma seminal foi positivamente correlacionada ao declínio da motilidade total no congelamento ( $\Delta C_{(MT)}$ ) ( $r=0,58$ ), na incubação pós-descongelamento ( $\Delta D_{(MT)}$ ) ( $r=0,52$ ), e ao longo de todo o período de avaliação ( $\Delta R_{(MT)}$ ) ( $r=0,60$ ). A relação entre a concentração proteica do plasma seminal e a resistência espermática ao congelamento foi também observada quando se comparou as médias entre os grupos. Como mostrado pela Figura 18C, o grupo RBp apresentou menor concentração de proteínas no plasma seminal, quando comparado ao grupo RRp. Essa diferença foi observada, na mesma intensidade, quando se considerou todos os ejaculados pertencentes a cada grupo (dosagem 1), e quando os ejaculados do subgrupo RBp/RRp<sub>sub</sub> foram retirados da análise (dosagem 2).

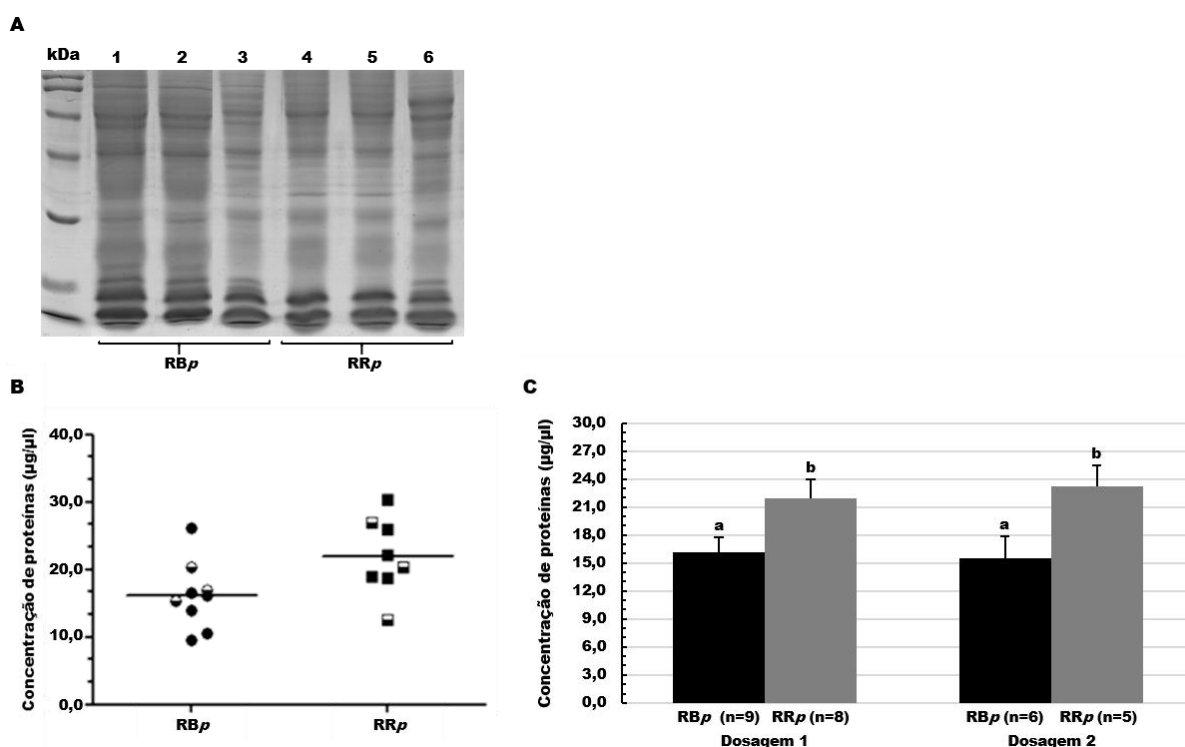


Figura 18. Avaliação da qualidade das proteínas do plasma seminal dos ejaculados de búfalos classificados de acordo com a resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento. (A) Representação do gel SDS-PAGE a 12% com 10 µg de proteína das amostras de plasma seminal de ejaculados RBp (1-3) e RRp (4-6), corado por *coomassie brilliant blue*, mostrando ausência de degradação proteolítica. (B) Distribuição da concentração proteica do plasma seminal obtida pelo método de Bradford, em um total de nove ejaculados no grupo RBp e oito no grupo RRp. Cada símbolo representa um ejaculado: subgrupo RBp<sub>sub</sub> – círculo preto; subgrupo RRp<sub>sub</sub> – quadrado preto; subgrupo RBp/RRp<sub>sub</sub> – símbolos preto e branco. A média de cada grupo está representada pela linha preta. (C) Média e erro-padrão da concentração proteica do plasma seminal dos grupos RBp e RRp, incluindo (Dosagem 1) ou excluindo (Dosagem 2) os ejaculados do subgrupo RBp/RRp<sub>sub</sub>. Para cada dosagem, as letras distintas indicam  $p \leq 0,05$ . RBp (ejaculados de resistência espermática boa,  $\Delta R_{(MT)} \leq 40\%$ ) e RRp (ejaculados de resistência espermática ruim,  $\Delta R_{(MT)} \geq 70\%$ ).

### 5.3.3. Avaliação intra e inter-indivíduo da reprodutibilidade do perfil proteômico do plasma seminal entre ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento

Posteriormente à avaliação da qualidade proteica das amostras de plasma seminal, que incluiu as dosagens individuais de proteínas, foram preparados géis bidimensionais (SDS-PAGE 12%) em strips de 7 cm e pH 4-7, corados por *coomassie brilliant blue* G250, de cada ejaculado dos grupos RBp e RRp. Além de permitir a avaliação da qualidade das amostras submetidas à 2D SDS-PAGE, a partir dessa técnica, foi possível avaliar o perfil proteômico de cada ejaculado de ambos os grupos RBp e RRp e analisar a similaridade desse perfil proteômico entre os dois ejaculados de cada animal e entre todos os ejaculados dentro de cada grupo (RBp e RRp) e subgrupo (RBp<sub>sub</sub>, RRp<sub>sub</sub>, RBp/RRp<sub>sub</sub>).

O perfil proteômico do plasma seminal foi muito similar entre todos os ejaculados avaliados, independentemente do animal do qual o ejaculado foi coletado e do grupo de resistência espermática ao congelamento. Na Figura 19, na qual estão apresentados os géis individuais, distribuídos de acordo com o animal e com o grupo e subgrupo aos quais pertencem, é possível observar a presença de muitos *spots*



comuns a todos os ejaculados, sendo esses *spots* principalmente os que apresentaram maior intensidade ótica. Visualmente, não foram observadas quaisquer características relacionadas à intensidade e/ou à localização dos *spots* no gel que pudessem diferenciar os grupos ou subgrupos. No entanto, foi possível perceber que além da grande semelhança visual observada entre todos os ejaculados avaliados, ainda mais similares entre si foram os perfis proteômicos dos dois ejaculados de cada animal.

Isso pôde ser observado na análise da reprodutibilidade dos géis, a partir da qual foram avaliadas a posição e o volume relativo (% volume) dos *spots* entre os géis. Nessa análise, quando os *spots* comuns aos géis avaliados são sobrepostos (*match*), e para isso esses *spots* devem apresentar a mesma posição nos dois géis, a porcentagem de volume desses *spots* é comparada entre as amostras. Assim, os resultados obtidos são indicativos da similaridade de cada *spot* entre os géis avaliados, de forma que quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de correlação obtido nessa avaliação, mais os valores de cada *spot* em um gel podem prever os valores dos *spots* correspondentes no outro gel. Na comparação entre os dois ejaculados do mesmo animal, observou-se uma relação linear entre o volume relativo dos *spots* de cada ejaculado, obtendo-se coeficientes de correlação acima de 0,70, para todas as amostras, como demonstrado na Figura 20. Isso indica que a similaridade entre os perfis proteômicos do plasma seminal dos dois ejaculados de cada animal, avaliados neste estudo, se aproxima daquela obtida entre replicatas biológicas (Görg et al., 2004).

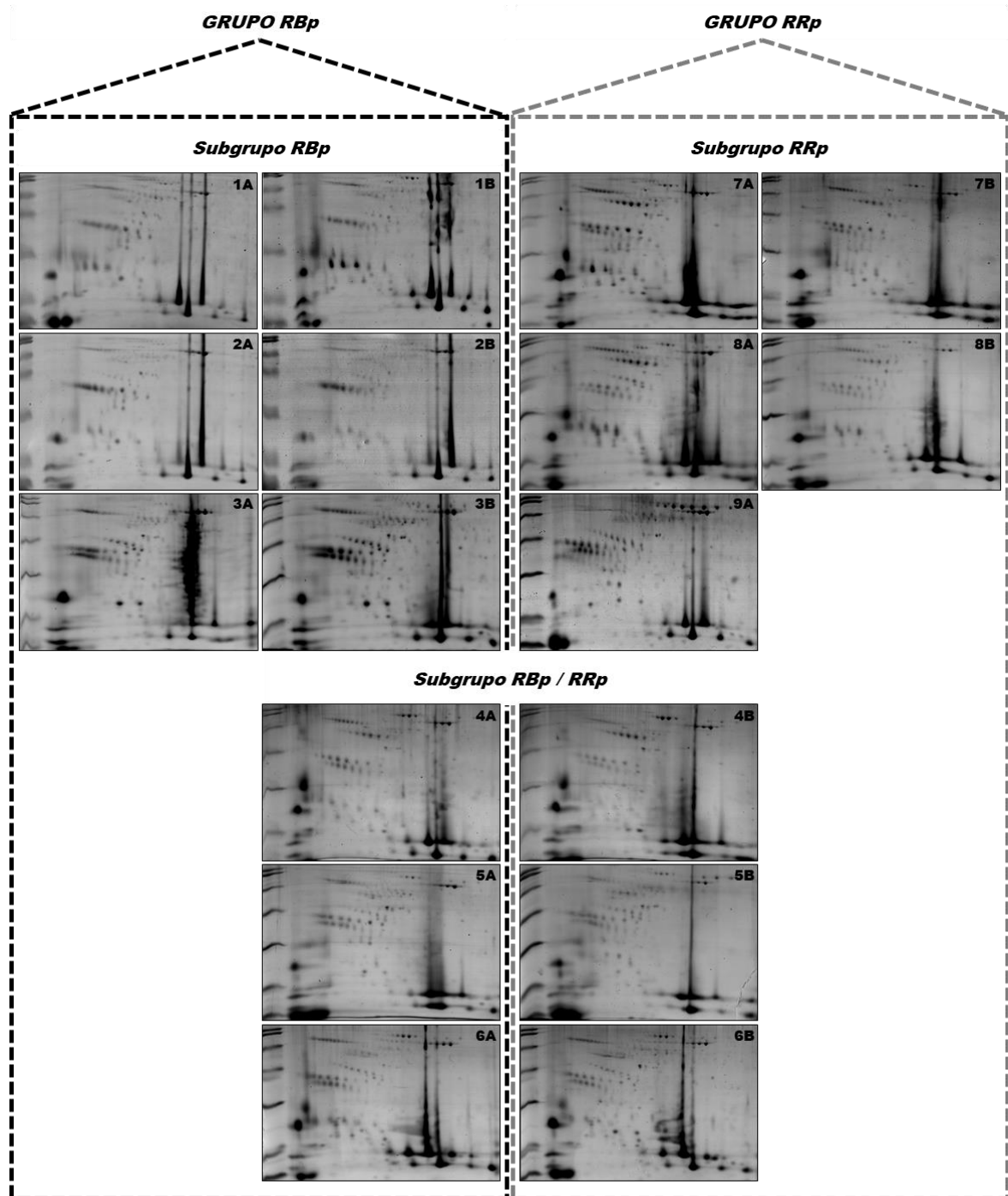


Figura 19. Perfil proteômico individual do plasma seminal recuperado de ejaculados de búfalos classificados de acordo com a resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento. Cada imagem representa um gel 2D SDS-PAGE a 12%, com 150 µg de proteína de uma amostra de plasma seminal em strips de 7 cm, pH 4-7, corados por *coomassie brilliant blue* G-250. São apresentados dois ejaculados (A-B) de cada animal (1-8), cujas imagens estão dispostas lado a lado, e um ejaculado (A) do animal 9. Grupo RBp: ejaculados de resistência espermática boa (linha tracejada preta, n = 9); Grupo RRp: ejaculados de resistência espermática ruim (linha tracejada cinza, n = 8); Subgrupo RBpsub: ejaculados RB de animais que apresentaram ejaculados exclusivamente RB (n = 6); Subgrupo RRpsub: ejaculados RR de animais que apresentaram ejaculados exclusivamente RR (n = 5); Subgrupo RBp/RRpsub: ejaculados RB e RR de animais que apresentaram ejaculados classificados como RB e RR (n = 6).

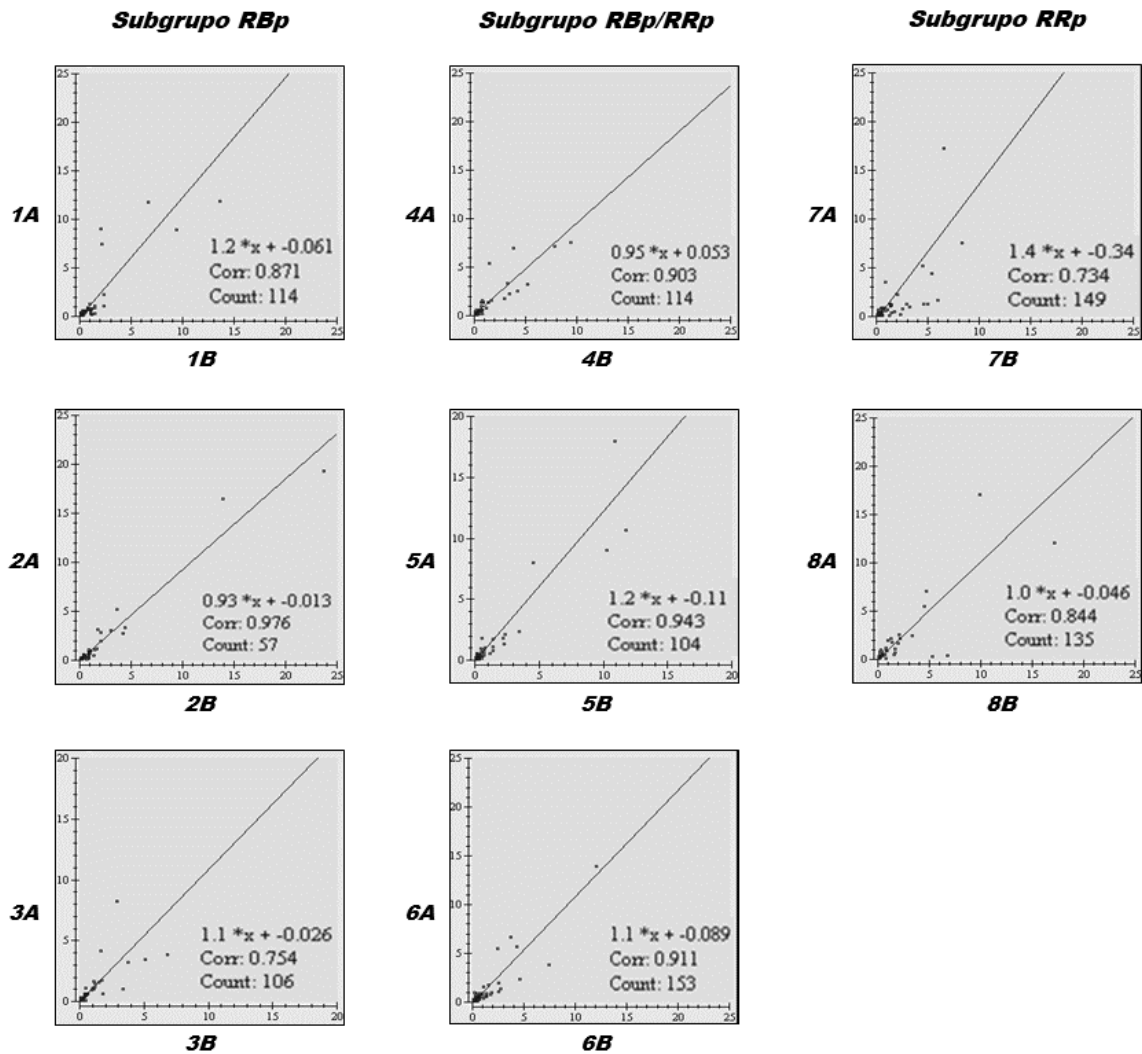


Figura 20. Reprodutibilidade do perfil proteômico do plasma seminal entre ejaculados do mesmo animal. Gráficos de dispersão da porcentagem de volume dos *spots* entre os dois ejaculados de cada animal. Os animais estão representados pelos números de 1 a 8. Cada ejaculado do animal está representado pelas letras A (eixo Y, gel referência) ou B (eixo X). Nas legendas: equação de regressão (acima); Corr: coeficiente de correlação (ao meio); Count: quantidade de *spots* sobrepostos (*match*) entre os dois géis.

Com o objetivo de verificar se as variações no perfil proteômico entre as amostras dentro dos grupos e subgrupos poderiam determinar uma classificação dos ejaculados diferente daquela realizada de acordo com a resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento, realizou-se a análise de agrupamentos dos géis com base na porcentagem de volume dos *spots* comuns. Na Figura 21, está apresentado o dendograma obtido a partir dessa análise. Os 17 ejaculados foram distribuídos em duas classes, sendo que em cada foram agrupadas todas as amostras pertencentes a um subgrupo, RBp<sub>sub</sub> (classe 1) ou RRp<sub>sub</sub> (classe 2). Inesperadamente, na classe 2 também foram agrupados todos os ejaculados do subgrupo RBp/RRp<sub>sub</sub>, tanto os ejaculados classificados como sendo de resistência espermática boa como aqueles de resistência espermática ruim. Dentro dessa classe, houve uma separação entre os subgrupos RBp/RRp<sub>sub</sub> e RRp<sub>sub</sub> em duas subclasses principais, sendo cada formada por todos os ejaculados pertencentes a cada subgrupo.

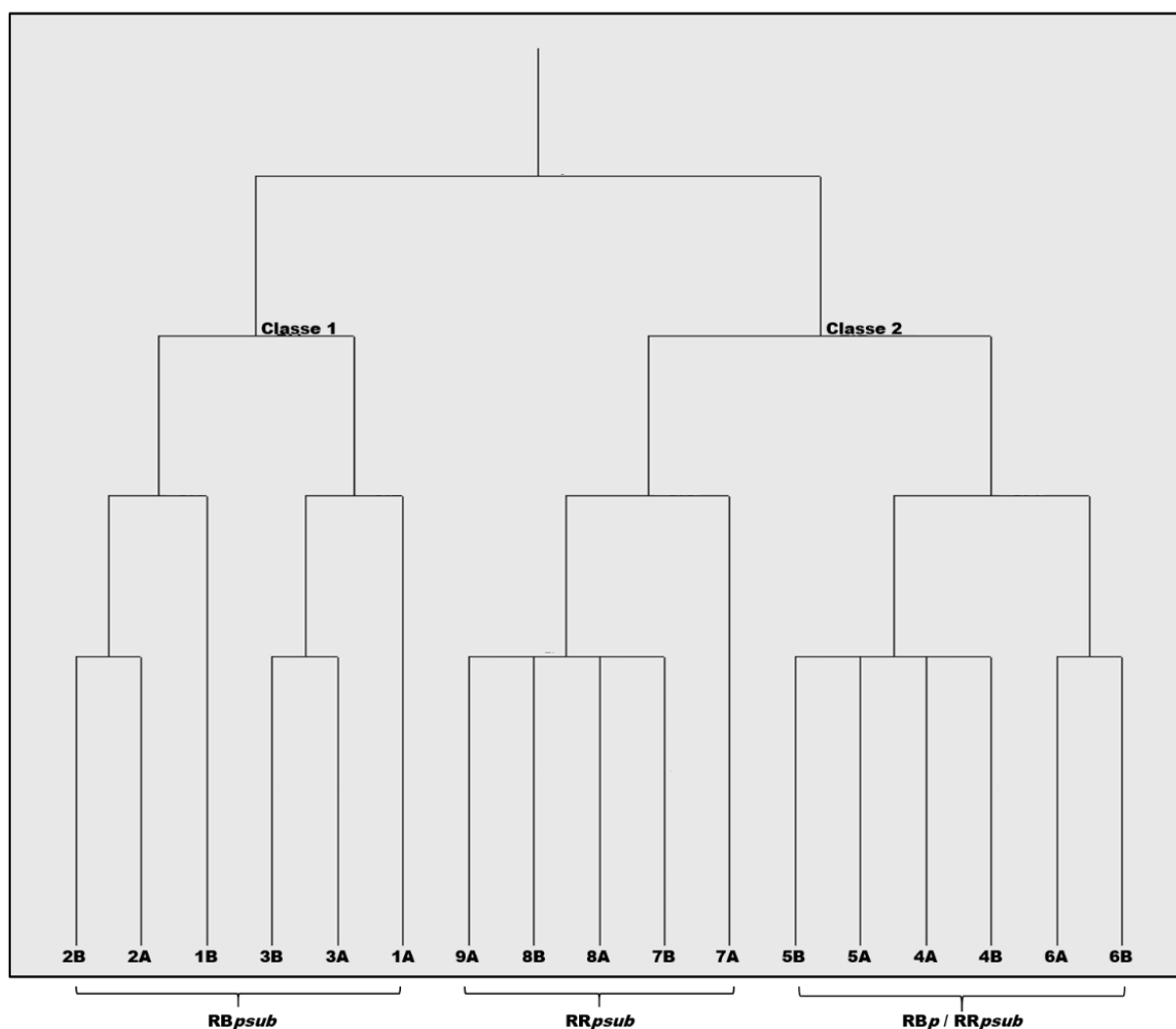


Figura 21. Análise de agrupamentos do perfil proteômico do plasma seminal dos ejaculados classificados como sendo de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento. Dendograma apresentando o agrupamento dos ejaculados em duas classes de acordo com a porcentagem de volume dos *spots* nos géis 2D SDS-PAGE obtidos a partir de amostras de plasma seminal. Os animais estão representados pelos números de 1 a 8. Cada ejaculado do animal está representado pelas letras A ou B. Subgrupo **RBpsub**: ejaculados RB de animais que apresentaram ejaculados exclusivamente RB ( $n = 6$ ); Subgrupo **RRpsub**: ejaculados RR de animais que apresentaram ejaculados exclusivamente RR ( $n = 5$ ); Subgrupo **RBp/RRpsub**: ejaculados RB e RR de animais que apresentaram ejaculados classificados como RB e RR ( $n=6$ ).

#### 5.3.4. Diferenças no perfil proteômico do plasma seminal entre ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento

A fim de avaliar se os ejaculados **RBp** e **RRp** apresentavam diferenças qualitativas e quantitativas na composição proteômica do plasma seminal que poderiam estar relacionadas à congelabilidade espermática, realizou-se a eletroforese em gel diferencial (DIGE). Para isso, foram formados pools de plasma seminal, um para cada grupo experimental (**RBp** e **RRp**), contendo quantidades similares de proteínas de cada amostra das quais foram constituídos. Após a análise de agrupamentos, realizada com os géis bidimensionais individuais (Figura 21), devido à não separação, entre as classes, dos ejaculados

RB e RR do subgrupo RBp/RRp<sub>sub</sub>, optou-se por não incluir essas amostras na análise DIGE. Dessa forma, os grupos RBp e RRp foram compostos apenas pelas amostras de plasma seminal dos animais que tiveram seus ejaculados exclusivamente classificados como de resistência boa (subgrupo RBp<sub>sub</sub>, n = 6) e ruim (subgrupo RRp<sub>sub</sub>, n=5), respectivamente. Na Figura 22, estão apresentadas as imagens dos géis DIGE, em escala de cinza, referentes ao pool de plasma seminal formado para cada grupo experimental, e as imagens dos géis bidimensionais individuais das amostras que compuseram cada pool.

Após a formação do pool de plasma seminal para cada grupo experimental e a marcação com os fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5 de acordo com a Tabela 4, foram produzidos e analisados um total de três géis. Como descrito no item 4.7.7, em cada gel foram aplicadas a mesma quantidade de proteínas dos pools de plasma seminal RBp e RRp, sendo cada pool marcado com um fluoróforo diferente. Dessa forma, em um mesmo gel, foi possível obter quantidades similares de proteínas dos grupos RBp e RRp e, devido à marcação com os fluoróforos, diferenciar nessa mistura quais proteínas e em qual abundância estão presentes no plasma seminal de cada grupo. Na Figura 23, estão representadas as imagens fluorescentes de um gel DIGE, referentes à marcação com os fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5 e à sobreposição das imagens obtidas dos três fluoróforos.

Para a comparação do perfil proteômico do plasma seminal entre os grupos RBp e RRp, foi necessária a identificação dos *spots* comuns a ambos os pools de plasma seminal, a partir da sobreposição das imagens obtidas de cada grupo (*match*), realizada no software DeCyder™ 2D Differential Analysis Software v7.2 (GE, Healthcare). A partir dessa sobreposição, foi realizada a comparação da intensidade de cada *spot* entre os grupos, sempre utilizando como parâmetro para as análises a porcentagem de volume do *spot*.

Por meio da análise de padrões, foi obtida a representação gráfica, em escala colorimétrica, da intensidade dos *spots* comuns para cada grupo experimental (Figura 24). A partir do *heat map* apresentado na Figura 24, no qual as cores vermelha e verde indicam intensidade aumentada e diminuída, respectivamente, é possível perceber uma diferença no perfil global de intensidade dos *spots* entre os grupos RBp e RRp. Enquanto para alguns *spots*, o grupo RBp apresenta maior intensidade da cor vermelha, indicando maior abundância da proteína correspondente, para outros *spots* essa maior intensidade é observada no grupo RRp. Essa diferença no perfil global de intensidade dos *spots* também foi observada a partir da análise de componentes principais, na qual foi possível agrupar as imagens dos três géis DIGE referentes a cada grupo experimental (Figura 24).

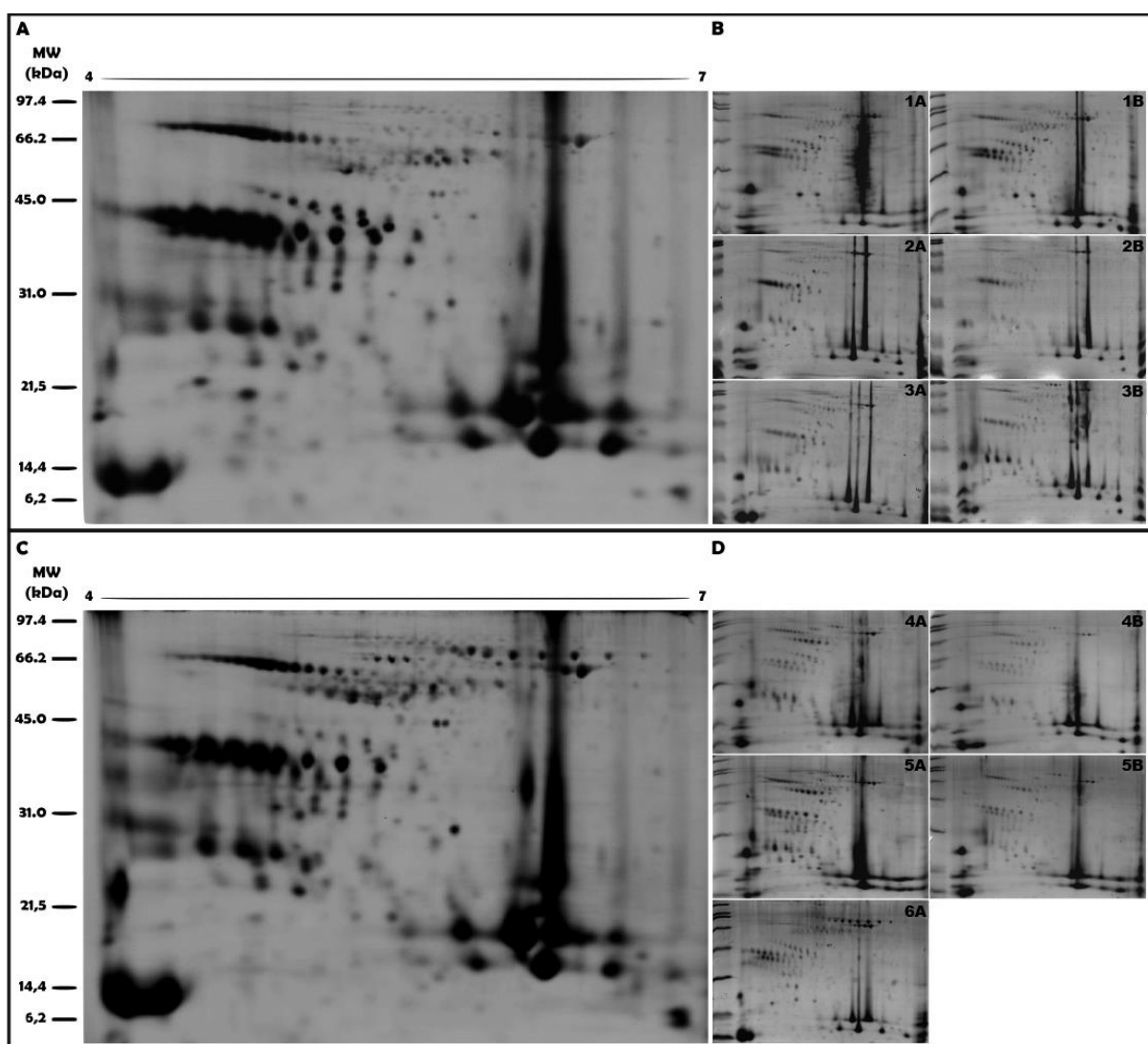


Figura 22. Perfil proteômico de pool de plasma seminal recuperado de ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento. Em A e C, imagens representativas de um gel DIGE, em escala de cinza, de pool de plasma seminal de ejaculados dos grupos RBp (A) e RRp (C), a partir de strips de 18 cm, pH 4-7, contendo 50  $\mu$ g de proteína de cada amostra previamente marcadas com os fluoróforos. Em B e D, imagens dos mini-géis 2D SDS-PAGE a 12%, corados por *coomassie brilliant blue* G-250, de cada amostra de plasma seminal dos grupos RBp (B) e RRp (D) utilizada para formar o respectivo pool. Cada mini-gel corresponde à 150  $\mu$ g de proteína, em strips de 7 cm e pH 4-7. Os animais estão representados pelos números 1-6 e as letras (A) e (B) em géis dispostos lado a lado representam diferentes ejaculados do mesmo animal.

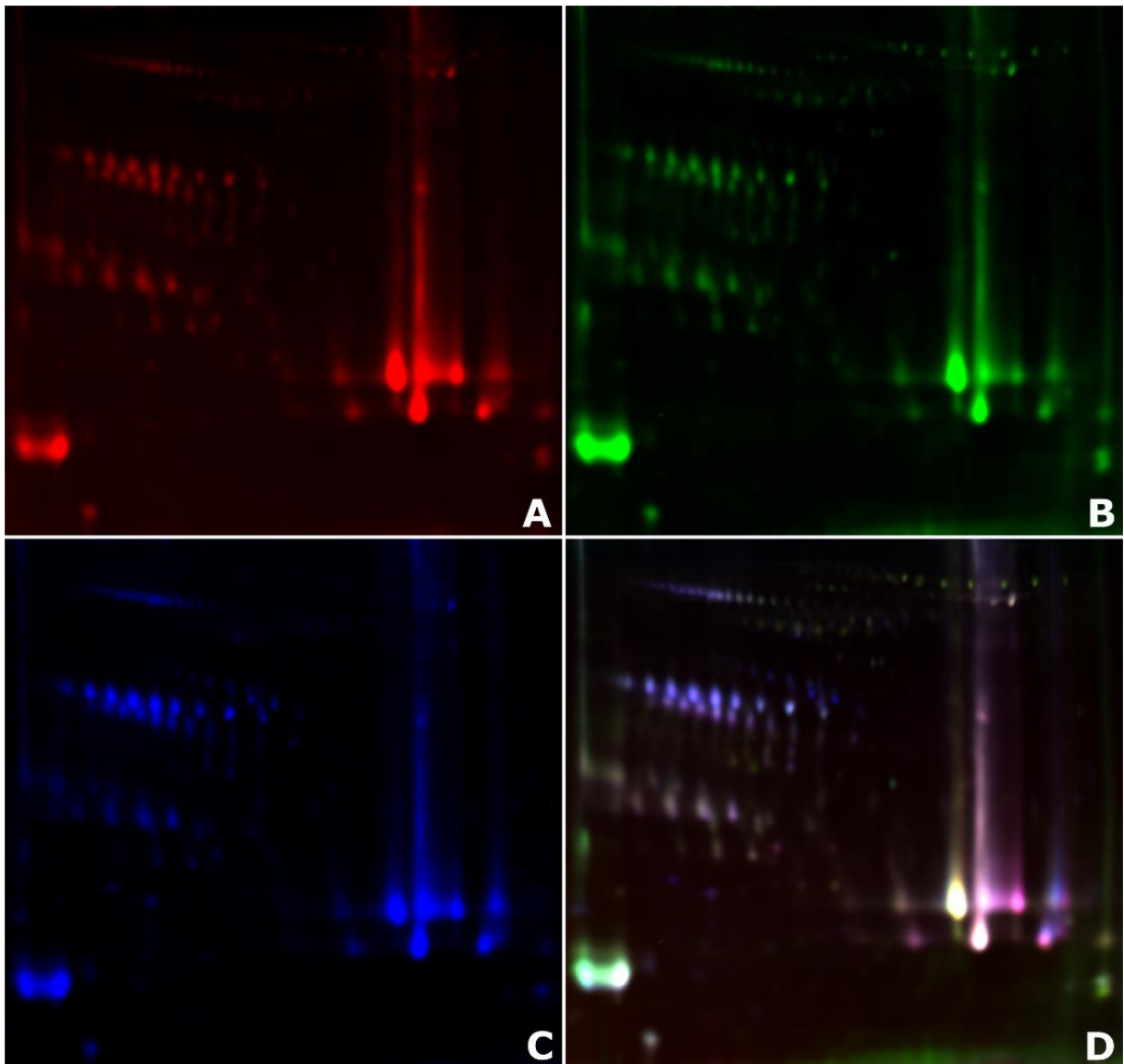


Figura 23. Perfil proteômico diferencial de pool de plasma seminal de ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento. Eletroforese em gel diferencial (DIGE). Imagens fluorescentes de gel 2D SDS-PAGE a 12%, a partir de tiras de 18 cm e pH 4-7, contendo 50  $\mu$ g de proteína do grupo RBp marcadas com Cy5 (vermelho) (A), 50  $\mu$ g de proteína do grupo RRp marcadas com Cy3 (verde) (B) e 25  $\mu$ g de proteína de cada grupo marcados com Cy2 (azul) (C). (D) Sobreposição das três imagens. Figura representativa de um único gel.

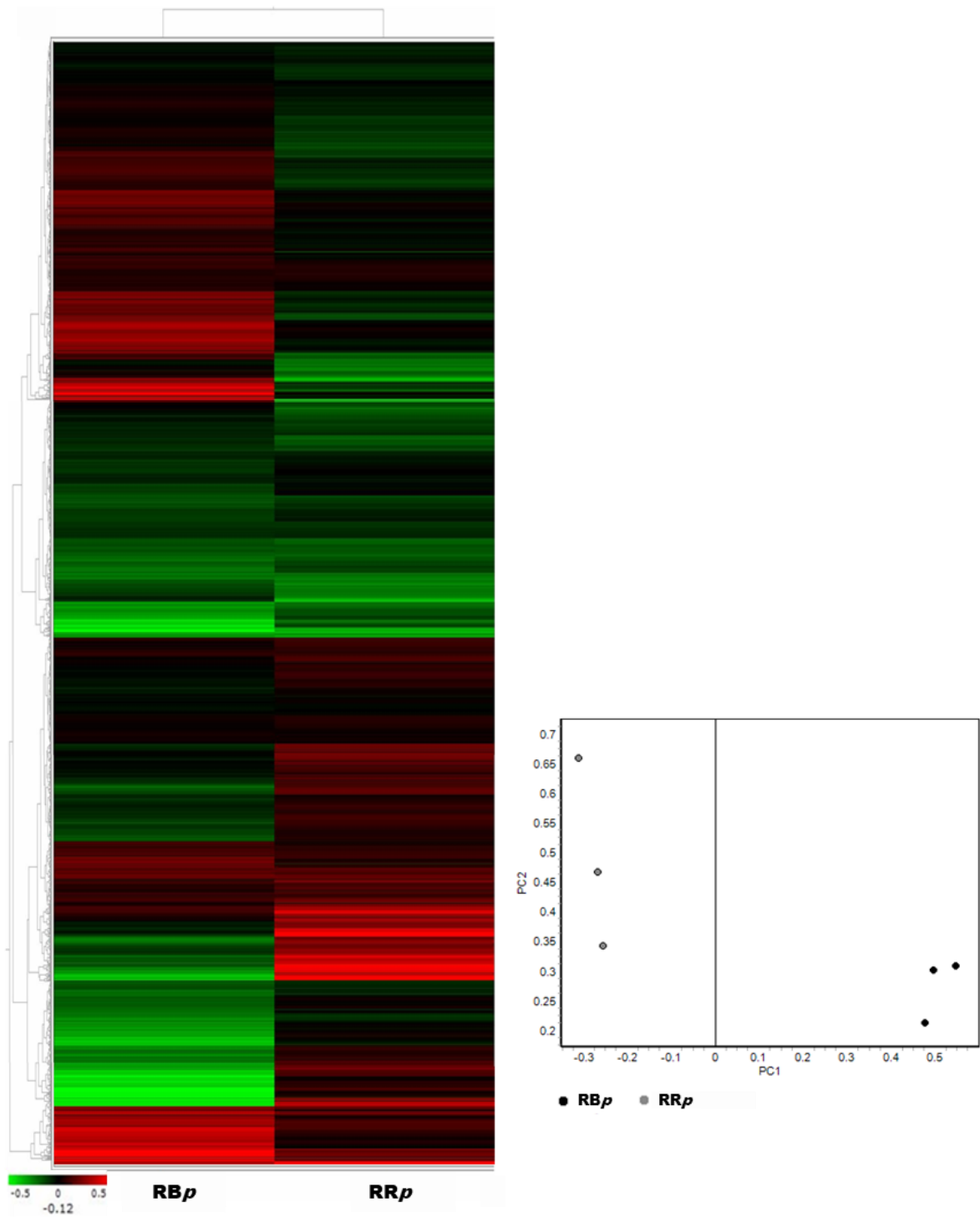


Figura 24. Perfil global de intensidade dos *spots* em gel 2D-DIGE preparado a partir de pools de plasma seminal recuperado de ejaculados de resistência espermática boa (RBp) e ruim (RRp) ao processo de congelamento-descongelamento. À esquerda, *heat map* da intensidade dos *spots* globais nos pools de plasma seminal dos grupos RBp e RRp. Cada linha corresponde a um *spot* comum a ambos os grupos. Os dados referentes à intensidade relativa dos *spots* estão apresentados como log da % de volume normalizada em escala colorimétrica, com variação de -0,5 a 0,5. A cor vermelha indica intensidade aumentada e a cor verde, intensidade diminuída. À direita, visualização da análise de componentes principais da intensidade dos *spots* globais, mostrando o padrão de distribuição das três imagens (círculos) dos géis DIGE referentes à cada grupo experimental.



Com o intuito de verificar se as diferenças na intensidade dos *spots*, observadas entre os pools de plasma seminal RBp e RRp, eram significativas, foi realizada a comparação por análise de variância (one-way ANOVA), considerando-se  $average\ ratio \geq 1,5$  e  $p \leq 0,05$ . A partir dessa análise, foram observados 34 *spots* diferencialmente intensos entre os pools de plasma seminal RBp e RRp. Desses, 30 *spots* apresentaram maior intensidade no grupo RBp e apenas quatro foram mais intensos no grupo RRp (Figuras 25 e 26). A representação gráfica por *heat map* da diferença, entre os grupos RBp e RRp, na intensidade dos *spots* selecionados pela ANOVA está apresentada na Figura 25. Observa-se que o grupo RBp apresenta predominantemente a cor vermelha, que indica intensidade aumentada, enquanto no grupo RRp predomina a cor verde, indicativa de intensidade diminuída. Exceções a esse padrão são observadas para os quatro *spots* mais intensos no grupo RRp.

Na Figura 26A e C, está apresentado o gel 2D-DIGE com os *spots* diferencialmente intensos selecionados e a representação gráfica da intensidade relativa de cada spot nos grupos RBp e RRp. Os valores de  $average\ ratio$ , que representa a razão da intensidade do *spot* entre os grupos RBp (referência) e RRp, variaram de 1,5 a 2,5 em 88,2% (30/34) dos *spots* selecionados, sendo que 63,3% (19/30) desses apresentaram  $average\ ratio \geq 2,0$ . Os quatro *spots* restantes, de maior intensidade no grupo RBp, apresentaram valores de  $average\ ratio$  iguais a 2,9 (*spot* 32), 2,9 (*spot* 26), 3,3 (*spot* 25) e 8,8 (*spot* 24). Na Figura 26A, observa-se o destaque de alguns *spots* localizados entre peso molecular de 33 kDa a 41 kDa, e ponto isoelétrico de 4,2 a 4,9, os quais representaram 41,2% (14/34) do número total de *spots* selecionados como diferencialmente intensos e 43,8% (27,3/62,2) da intensidade relativa ( $average\ ratio$ ) total. Os dados referentes à intensidade relativa, peso molecular e ponto isoelétrico desses *spots* estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15.  $Average\ ratio$ , peso molecular e ponto isoelétrico dos *spots* diferencialmente intensos no pool de plasma seminal RBp, destacados na Figura 26A

<i>Spots</i> <sup>1</sup>	$Average\ ratio$ <sup>2</sup>	MW (kDa)	pI
5	1,9	41,0	4,2
7	2,3	40,0	4,3
8	2,4	39,0	4,5
9	2,0	38,0	4,7
10	2,1	36,0	4,6
11	1,6	36,0	4,7
12	1,5	34,0	4,9
14	1,6	33,0	4,9
18	2,0	36,0	4,6
19	2,3	38,0	4,6
20	2,3	37,0	4,4
21	2,0	38,0	4,3
22	1,9	38,0	4,2
34	1,5	35,0	4,8

<sup>1</sup>*Spots* dos géis 2D-DIGE diferencialmente intensos destacados na Figura 26A; <sup>2</sup> $Average\ ratio$  obtida no software DeCyder™ 2D Differential Analysis Software v7.2 (GE, Healthcare)

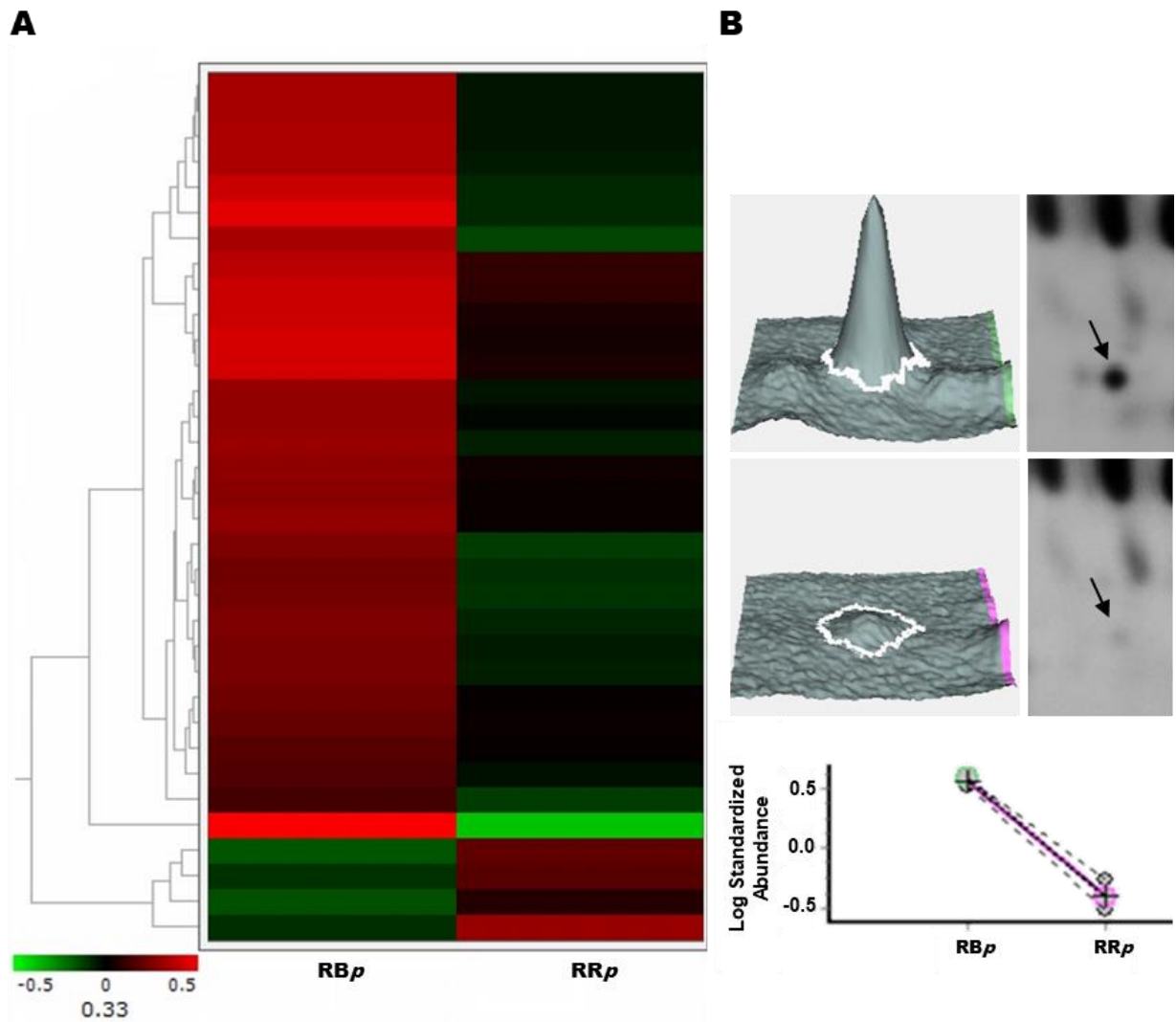


Figura 25. Representação dos *spots* diferencialmente intensos nos pools de plasma seminal de ejaculados de resistência espermática boa (RBp) e ruim (RRp) ao processo de congelamento-descongelamento. (A) *Heat map* da % de volume dos *spots* diferencialmente intensos nos pools de plasma seminal dos grupos RBp e RRp. Cada linha corresponde a um *spot* comum a ambos os grupos. Os dados referentes à intensidade dos *spots* estão apresentados como log da % de volume normalizada em escala colorimétrica, com variação de -0,5 a 0,5. A cor vermelha indica intensidade aumentada e a cor verde, intensidade diminuída. (B) Figura representativa de um *spot* diferencialmente intenso entre os grupos RBp (imagens superiores) e RRp (imagens inferiores). À direita, *spot* selecionado (setas) no gel DIGE, em escala de cinza. À esquerda, representação 3D do *spot* selecionado. Abaixo, gráfico mostrando a diferença na intensidade do *spot* selecionado entre os grupos RBp e RRp. Dados apresentados como log da % de volume normalizada para as três imagens dos géis DIGE obtidas de cada grupo experimental.

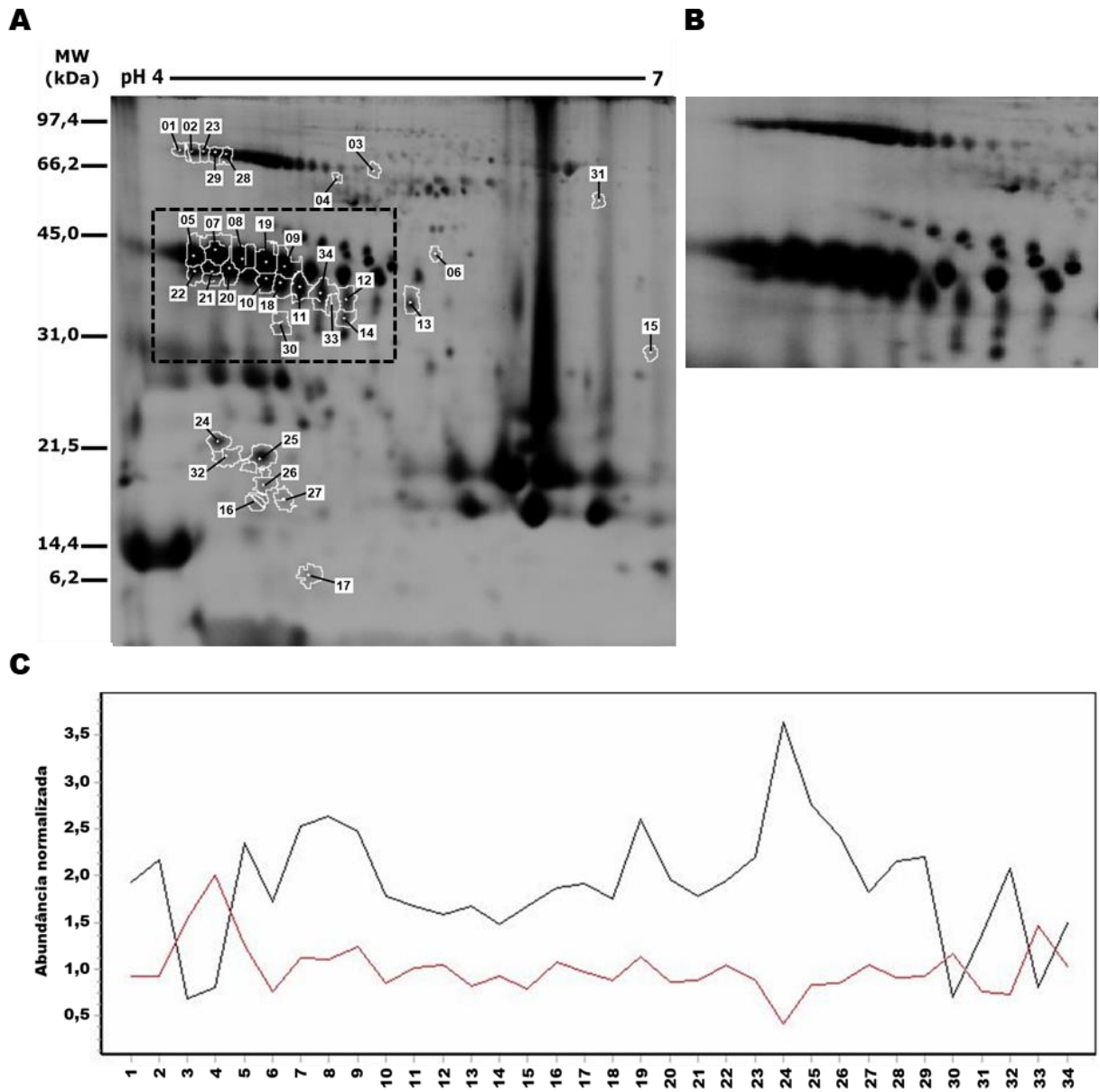


Figura 26. *Spots* diferencialmente intensos, em gel 2D-DIGE, nos pools de plasma seminal de ejaculados de resistência espermática boa (RBP) e ruim (RRP) ao processo de congelamento-descongelamento. (A) Imagem de um gel 2D-DIGE (*strips* de 18 cm e pH 4-7), em escala de cinza, mostrando os *spots* diferencialmente intensos entre os grupos RBP e RRP (*average ratio*  $\geq 1,5$ ), selecionados a partir da ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). (B) Ampliação da área selecionada no gel 2D-DIGE em (A). (C) Intensidade normalizada dos *spots* selecionados como diferencialmente intensos. Os números no eixo horizontal correspondem aos *spots* demarcados em (A).

Dos 34 *spots* diferencialmente intensos, 21 foram visualizados nos géis, sendo possível sua excisão para a identificação das proteínas por espectrometria de massas, a qual se encontra em andamento. Priorizou-se, para este estudo, a identificação dos 14 *spots* destacados na Figura 26A, mais intensos no grupo RBp, por representarem grande proporção tanto do total de *spots* diferencialmente intensos quanto da intensidade relativa total dos *spots* no gel. Além disso, priorizou-se a identificação do *spot* 30, mais intenso no grupo RRp, por apresentar peso molecular (33 kDa) e ponto isoelétrico (4,6) dentro do intervalo dos valores apresentados pelo grupo de *spots* destacados na Figura 26A.

Dos *spots* selecionados para este estudo, foram identificados 12 *spots*, sendo 11 (*spots* 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 34\_Figura 26A), de maior intensidade no grupo RBp, todos correspondentes à proteína clusterina; e o *spot* restante (*spot* 30\_Figura 26A), de maior intensidade no grupo RRp, identificado como a proteína 14-3-3 zeta/delta. Nas Tabelas 16 e 17, estão apresentados os dados referentes à identificação dos *spots* selecionados como diferencialmente intensos.

Tabela 16. Dados numéricos e percentuais referentes à seleção, excisão e identificação dos *spots* diferencialmente intensos no pool de plasma seminal RBp, avaliados por DIGE e selecionados para a espectrometria de massas

	<i>Spots</i> totais <sup>a</sup>	<i>Spots</i> priorizados <sup>b</sup>
<sup>1</sup> <i>Spots</i> diferencialmente intensos	34	15
<sup>2</sup> <i>Spots</i> visualizados no gel 2D-DIGE	21	13
<sup>3</sup> <i>Spots</i> identificados por espectrometria de massas	12 (/21)	12 (/13)
<b>Nº total de proteínas identificadas</b>	2	2

<sup>a</sup>Número total de *spots* selecionados como diferencialmente intensos; <sup>b</sup>*Spots* destacados na Figura 26A - priorizados para identificação por MS/MS.

<sup>1</sup>*Spots* dos géis 2D-DIGE diferencialmente intensos, analisados no software DeCyder™ 2D Differential Analysis Software v7.2 (GE, Healthcare), utilizando *average ratio*  $\geq 1,5$  e  $p \leq 0,05$ .

<sup>2</sup>*Spots* visualizados e excisados no gel 2D-DIGE após coloração com *coomassie brilliant blue* G-250.

<sup>3</sup>Identificação por espectrometria de massas em MALDI-TOF/TOF.

Tabela 17. Proteínas diferencialmente abundantes no plasma seminal de ejaculados de búfalos de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento

Proteína / spot <sup>a</sup>	Nome da proteína	Acesso (NCBI) <sup>b</sup>	Gene	KDa/pI preditos	KDa/pI experimental	Escore da proteína (MS/MS)	RBp / RRp <sup>c</sup>	Sequência do(s) peptídeo(s)
<b>Clusterina (<i>Bos taurus</i>)</b>								
spot 7	Clusterin precursor	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	40,0 / 4,3	36	2,3	R.LYDQLLQSYQQK.M
spot 8	CLUS_BOVIN	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	39,0 / 4,5	80	2,4	R.LYDQLLQSYQQK.M
spot 9	CLUS_BOVIN	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	38,0 / 4,7	64	2,0	R.LYDQLLQSYQQK.M
spot 10	CLUS_BOVIN	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	36,0 / 4,6	49	2,1	R.ASSIMDELFQDR.F
spot 11	Clusterin precursor	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	36,0 / 4,7	69	1,6	K.TQIEQTNEER.K R.ASSIMDELFQDR.F + Oxidation (M) R.EQSHVMDVMEDSFTR.A R.RPQDTQYYSPFSSFP.R
spot 12	Clusterin precursor	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	34,0 / 4,9	37	1,5	R.EQSHVMDVMEDSFTR.A
spot 18	Clusterin preproprotein	NP_776327.1	CLU	51,7 / 5,73	36,0 / 4,6	83	2,0	R.RPQDTQYYSPFSSFP.R
spot 19	CLUS_BOVIN	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	38,0 / 4,6	98	2,3	R.LYDQLLQSYQQK.M
spot 20	Clusterin precursor	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	37,0 / 4,4	62	2,3	K.TQIEQTNEER.K R.ASSIMDELFQDR.F + Oxidation (M) R.RPQDTQYYSPFSSFP.R
spot 21	Clusterin precursor	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	38,0 / 4,3	26	2,0	R.EQSHVMDVMEDSFTR.A
spot 34	Clusterin precursor	P17697.1	CLU	51,7 / 5,73	35,0 / 4,8	54	1,5	K.TQIEQTNEER.K R.ASSIMDELFQDR.F + Oxidation (M) R.RPQDTQYYSPFSSFP.R
<b>14-3-3 Zeta/Delta (<i>Bos taurus</i>)</b>								
spot 30	14-3-3 Zeta/Delta	1433Z_Bovin	YWHAZ	27,9 / 4,73	33,0 / 4,64	53	-1,7	K.GIVDQSQQAYQEAFEISK.K

Spots selecionados em gel 2D-DIGE por ANOVA no software DeCyder™ 2D Differential Analysis Software v7.2 (GE, Healthcare), utilizando *average ratio* 1,5 e  $p \leq 0,05$ . <sup>a</sup> Número correspondente aos spots da Figura 26; <sup>b</sup> Número de acesso à proteína de acordo com o NCBI; <sup>c</sup> *Average ratio*

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, objetivou-se avaliar as diferenças no perfil proteômico do plasma seminal de búfalos (*Bubalus bubalis*) que estão relacionadas à resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. Os resultados apresentados demonstram uma grande variação entre animais e entre ejaculados na sobrevivência dos espermatozoides ao congelamento-descongelamento, e a existência de diferenças no perfil proteômico do plasma seminal entre os ejaculados que apresentaram a maior e a menor resistência ao processo. A resistência espermática ao congelamento-descongelamento foi caracterizada pela proporção de células que se mantiveram móveis até 180 minutos após o descongelamento e, por isso, utilizou-se como parâmetro para classificação dos ejaculados o declínio da motilidade total entre a avaliação inicial (imediatamente antes do resfriamento) e a final (180 minutos após o descongelamento). Esse foi o primeiro estudo a demonstrar, na espécie bubalina, a variabilidade inter e intra-indivíduo da resistência dos espermatozoides ao congelamento-descongelamento, considerando a sobrevivência ao congelamento e a longevidade após o descongelamento, e a possível influência da composição proteômica do plasma seminal nessa característica.

Demonstrou-se que, assim como em outras espécies (Roca et al., 2006; Rickard et al., 2015; Magalhães et al., 2016), em touros búfalo, ejaculados de mesma qualidade espermática inicial apresentam uma grande variação na resistência dos seus espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento. Enquanto os ejaculados que detinham os espermatozoides mais resistentes apresentaram declínio de aproximadamente 20% na motilidade total, aqueles cujos espermatozoides foram os menos resistentes apresentaram aproximadamente 100% de declínio entre a avaliação pré-resfriamento e 180 minutos de incubação após o descongelamento (Figura 4). Quando avaliada a média dos ejaculados de cada animal, a redução da porcentagem de espermatozoides móveis do início do processo ao fim da incubação pós-descongelamento variou de 40% a 75% entre os doadores (Figura 7). No entanto, ao se avaliar separadamente os ejaculados de um mesmo animal, foi observada grande dispersão dos valores para cima e para baixo da respectiva média (Figura 8). Esses resultados sugerem que, para alguns animais, a média dos ejaculados não representa a variabilidade da resposta dos espermatozoides ao congelamento. Assim, diferentemente do que foi proposto para a espécie suína (Roca et al., 2006), animais que apresentam, em média ou frequentemente, boa qualidade e longevidade espermáticas após o descongelamento podem eventualmente apresentar ejaculados de má congelabilidade espermática. Do ponto de vista prático, os resultados aqui apresentados sugerem que a escolha de touros búfalo para o congelamento de espermatozoides com base em avaliações pós-descongelamento de um pequeno número de ejaculados pode gerar resultados indesejáveis. Ainda que esteja disponível um histórico extenso de avaliações de doses congeladas do animal, é necessária uma avaliação cuidadosa, visto que variações entre animais ou entre ejaculados na qualidade espermática após o descongelamento também podem ser influenciadas por diferenças entre os protocolos de congelamento utilizados (Dhami et al., 1996; Yu et al., 2002).

As causas da variação na congelabilidade espermática intra-espécie não estão bem definidas, mas foi demonstrado que essa característica pode ser influenciada por diversos fatores como raça, idade, sazonalidade, nutrição, entre outros (Andrabi, 2009; Yeste, 2016; Brito, 2018). Sabe-se que, na espécie bubalina, a sazonalidade é um importante fator que pode influenciar determinadas características reprodutivas, sendo uma delas a congelabilidade espermática (Brito, 2018). No presente estudo, os congelamentos de espermatozoides foram realizados ao longo de nove meses (abril a dezembro). Dessa forma, com o objetivo de verificar se a característica sazonal da espécie poderia interferir na variação da resistência espermática ao congelamento-descongelamento, foi realizada uma cuidadosa avaliação dos resultados obtidos para cada ejaculado de todos os animais. Nesse sentido, é importante destacar que não foram observadas variações tanto na qualidade do sêmen *in natura* quanto na resistência dos espermatozoides ao congelamento que indicassem haver a interferência da estação do ano sobre essas características. Ressalta-se ainda que a influência de fatores, como os citados acima, apresenta pouca importância para os resultados obtidos no presente estudo, visto que o objetivo deste trabalho foi identificar as diferenças no perfil de proteínas do plasma seminal que caracterizam os ejaculados de

maior e menor resistência ao congelamento-descongelamento. Dessa forma, os fatores que vão influenciar a secreção das proteínas que compõem o plasma seminal são alvo de estudos posteriores que, inclusive, poderão avaliar os mecanismos pelos quais essas proteínas conferem maior ou menor proteção ao espermatozoide durante o congelamento-descongelamento.

Além dos fatores citados anteriormente, a resposta dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento pode ser influenciada pelo protocolo de congelamento utilizado, incluindo o meio diluidor (Dhami et al., 1996). Variações inter e intra-indivíduo na qualidade espermática após o descongelamento frente a alterações no protocolo de congelamento foram demonstradas em bovinos (Chaveiro et al., 2006), suínos (Medrano et al., 2009), caninos (Yu et al., 2002) e bubalinos (Dhami et al., 1996). No presente estudo, entretanto, todos os ejaculados foram submetidos ao mesmo protocolo de congelamento, de forma que a resistência dos espermatozoides não fosse influenciada por variações metodológicas entre os dias de coleta.

Durante o processo de congelamento-descongelamento, a sobrevivência espermática pode ser afetada pelos danos provocados às estruturas celulares, particularmente aqueles causados pelo estresse osmótico, choque térmico e formação de gelo nos meios intra e extracelular (Watson, 2000). Assim, após o descongelamento, espera-se uma redução significativa da motilidade total, devido à baixa sobrevivência de parte dos espermatozoides ao protocolo de congelamento (Rasul et al., 2001; Kumar et al., 2014). Durante o período de incubação após o descongelamento, as alterações na motilidade e no padrão do movimento espermático são consequência dos danos não letais provocados principalmente à membrana plasmática (Ahmad et al., 2015) e/ou à redução da disponibilidade de ATP devido ao comprometimento da atividade mitocondrial (Kumar et al., 2014). No presente estudo, pequena redução da motilidade total foi observada imediatamente após o descongelamento, indicando elevada sobrevivência dos espermatozoides ao protocolo utilizado. Isso sugere que o meio diluidor e o protocolo de congelamento minimizaram os efeitos do criodano sobre a célula espermática (Sansone et al., 2000; Watson, 2000). Experimentos prévios a este estudo permitiram que fossem determinados tanto o meio diluidor quanto a taxa de resfriamento com os quais poder-se-ia obter maior sobrevivência espermática ao congelamento, sem, contudo, eliminar a variação entre animais e entre ejaculados na qualidade e longevidade dos espermatozoides após o descongelamento. Isso foi particularmente importante para que fosse possível identificar os ejaculados que, de fato, apresentassem os espermatozoides menos resistentes ao processo de congelamento-descongelamento, mesmo que submetidos a um protocolo ajustado para favorecer a sobrevivência celular.

Mesmo que uma grande proporção dos espermatozoides tenha se mantido móvel imediatamente após o descongelamento, um aumento progressivo da variação entre ejaculados na sobrevivência espermática foi observada ao longo do período de incubação pós-descongelamento. Considerando o declínio da motilidade total do início do resfriamento ao fim da incubação pós-descongelamento, grande parte da variação entre os animais e entre os ejaculados foi observada ao longo do período de incubação após o descongelamento. Esses achados permitem inferir que a longevidade dos espermatozoides após o descongelamento foi o principal determinante da resistência espermática ao processo. Dessa forma, as diferenças observadas entre os ejaculados na motilidade e no movimento dos espermatozoides estariam principalmente relacionadas às alterações funcionais das células que sobreviveram ao protocolo de congelamento-descongelamento (Watson, 2000; Muiño et al., 2008; Ahmad et al., 2014).

A variação na resistência espermática permitiu identificar os ejaculados que apresentaram os espermatozoides mais resistentes e os menos resistentes ao congelamento-descongelamento. Os ejaculados de maior resistência apresentaram maior sobrevivência espermática tanto no congelamento quanto no período de incubação após o descongelamento. Esses resultados indicam que os espermatozoides dos ejaculados de maior resistência foram mais tolerantes ao criodano. De fato, ainda que discretamente, alterações na motilidade espermática ao final do tempo de equilíbrio (avaliação pré-congelamento) foram apresentadas apenas pelos ejaculados de menor resistência espermática, em contraste a estudos que demonstraram que os espermatozoides bubalinos não apresentaram queda da

motilidade e do potencial mitocondrial ao final desse período, antes do congelamento (Rasul et al., 2001; Kumar et al., 2014).

Resultado interessante foi observado na qualidade do sêmen *in natura*, entre os ejaculados de maior e menor resistência espermática ao congelamento-descongelamento (Tabela 9). Os ejaculados menos resistentes ao processo apresentaram maior volume e menor concentração espermática, o que influenciou a proporção sêmen/diluidor (Tabela 10). Considerando que a concentração de espermatozoides final da dose foi a mesma para ambos os grupos, esses resultados mostram que os ejaculados menos resistentes foram submetidos ao congelamento com maior volume de plasma seminal e menor volume de diluidor. Assim, pode-se considerar que os espermatozoides desses ejaculados iniciaram o processo com menor aporte de elementos crioprotetores e substratos energéticos para o metabolismo celular e, por isso, tiveram menores condições de suportar os desafios impostos pelo congelamento-descongelamento (Andrabi, 2009; Layek et al., 2016). Além disso, o contato dos espermatozoides com maior quantidade de elementos do plasma seminal, devido ao maior volume dessa fração do sêmen, pode ter sido suficiente para que houvesse a interação entre componentes do plasma seminal e os espermatozoides, como por exemplo proteínas com efeitos deletérios durante o congelamento, tornando-os mais suscetíveis ao criodano (Singh et al., 2014; Rickard et al., 2015). No entanto, é interessante observar que os ejaculados selecionados, em ambos os grupos, para a análise proteômica, não apresentaram diferenças nessas características, assim como na concentração de proteínas do plasma seminal e, portanto, a diferença observada na sobrevivência ao congelamento e longevidade pós-descongelamento está, provavelmente, mais relacionada às diferenças no perfil proteômico do plasma seminal e, mais especificamente, nas proteínas identificadas, o que será discutido adiante.

Uma das explicações para as diferenças entre ejaculados na resistência dos espermatozoides ao congelamento-descongelamento é a composição proteica do plasma seminal. As proteínas do plasma seminal participam da modulação da função espermática entre a ejaculação e a fertilização do oócito (revisado por Moura e Memili, 2016) e, além disso, influenciam a suscetibilidade da célula espermática durante o processo de congelamento-descongelamento (Srivastava et al., 2012; Pini et al., 2018). No presente estudo, a partir da técnica 2D-DIGE, foi demonstrado que os ejaculados de maior e menor resistência espermática ao congelamento-descongelamento apresentaram diferenças no perfil proteômico do plasma seminal, com maior intensidade de 30 *spots* nos ejaculados mais resistentes e quatro nos menos resistentes. Estudos em bovinos (Jobim et al., 2004), equinos (Jobim et al., 2011), suínos (Vilagran et al., 2015) e ovinos (Rickard et al., 2016) demonstraram diferenças na composição proteômica do plasma seminal entre animais ou ejaculados que apresentaram alta e baixa congelabilidade espermática. Em búfalos, trabalhos mostraram diferenças na concentração, no plasma seminal, de proteínas ligadoras de heparina e, mais especificamente, da proteína PDC-109 entre ejaculados que apresentaram maior e menor qualidade espermática após o descongelamento (Singh et al., 2013; 2014).

No presente estudo, a proteína Clusterina foi identificada em 12 dos 14 *spots* priorizados para análise, que apresentaram maior intensidade nos ejaculados de maior resistência espermática ao congelamento-descongelamento. Os *spots* identificados estavam localizados em um agrupamento de 14 *spots*, cujos peso molecular e pI variaram de 33 a 41 kDa, e de 4,2 a 4,9, respectivamente. Estudos sobre o plasma seminal de bovinos identificaram a clusterina em *spots* localizados no gel 2D SDS-PAGE entre 36 e 46 kDa e pI de 3,9 a 5,6 (Boe-Hansen et al., 2015; Menezes et al., 2017). Recentemente, no plasma seminal de búfalos, proteínas clusterina (isoforma X1) foram identificadas, a partir de gel 2D SDS-PAGE, apresentando peso molecular de 32 a 38,7 kDa e pI de 4,0 a 4,8 (Brito, 2018). Variações no peso molecular e ponto isoelétrico de uma mesma proteína, detectados por eletroforese em gel bidimensional, sugerem a ocorrência de modificações pós-traducionais (MPTs), como fosforilação, glicosilação, acetilação e outras (Baker, 2016). Essas modificações podem gerar a visualização de uma mesma proteína em diferentes posições no gel 2D, como por exemplo, uma linha horizontal de *spots* (Man e Jensen, 2003), como observado no presente trabalho. Dessa forma, os resultados encontrados sugerem



que todos os 14 *spots* destacados (33 – 41 kDa, pI 4,2 – 4,9), que se apresentaram como um agrupamento, correspondem à proteína clusterina. Considerando que aqueles *spots* representaram aproximadamente 40% da diferença no perfil proteômico do plasma seminal entre os ejaculados de maior e menor resistência espermática, por essa hipótese, a clusterina seria o principal componente proteômico do plasma seminal relacionada à congelabilidade espermática.

A clusterina é uma glicoproteína presente em várias células, tecido e fluidos biológicos de mamíferos, nos quais apresenta múltiplas funções relacionadas à proteção, reparo e apoptose celular (Bailey e Griswold, 1999; Jones e Jomary, 2002). Diferentes isoformas da clusterina foram identificadas nos fluidos epididimário e das glândulas sexuais acessórias, principalmente glândulas vesiculares, em bovinos (Moura et al., 2007; Moura et al., 2010; Blleannée et al., 2011; Westfalewicz et al., 2017), e no plasma seminal de bovinos (Mortarino et al., 1998; Kelly et al., 2006; Rego et al., 2015; Westfalewicz et al., 2017), *Bos javanicus* (Sarsaifi et al., 2015), ovinos (Rickard et al., 2006) e, mais recentemente, de búfalos (Brito et al., 2018). A abundância da clusterina no plasma seminal tem sido relacionada à qualidade espermática no sêmen fresco e após o descongelamento. Maior abundância da clusterina foi observada no plasma seminal de touros *Bos javanicus* que apresentaram melhor qualidade espermática no sêmen fresco (Sarsaifi et al., 2015) e de touros bovinos classificados como sendo de alta congelabilidade espermática (Jobim et al., 2004). Além disso, a abundância da clusterina no plasma seminal de bovinos foi positivamente correlacionada à motilidade total e vigor espermático após o descongelamento (Menezes et al., 2017). Esses e outros resultados têm sugerido a clusterina como uma proteína que favorece a função espermática e protege a célula durante a preservação. Sua concentração, tanto no espermatozoide quanto no plasma seminal, tem sido associada às suas funções como chaperona (Humphreys et al., 1999; Wilson and Easterbrook-Smith, 2000; Salehi et al., 2013) e de proteção contra o estresse oxidativo, sendo essa devido às suas propriedades antioxidantes e capacidade de regulação da apoptose induzida pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) (Reyes-Moreno et al., 2002; Boe-Hansen et al., 2015).

Sabe-se que a criopreservação provoca o desequilíbrio entre a produção e a eliminação de EROS, levando a célula espermática à condição de estresse oxidativo. Parte da redução da sobrevivência e viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento é consequência dos danos causados pelas EROS à membrana plasmática, DNA e às mitocôndrias (Lamirande e Gagnon, 1992). No presente estudo, tendo em vista sua ação antioxidante, a clusterina em maior abundância no plasma seminal dos ejaculados de maior resistência espermática poderia ter conferido proteção aos espermatozoides contra os danos causados pelo estresse oxidativo durante o congelamento-descongelamento. Assim, a maior longevidade da motilidade espermática após o descongelamento, apresentada por esses ejaculados, poderia ser decorrente da menor intensidade dos danos à membrana plasmática e às mitocôndrias (Kumar et al., 2014). Isso também justificaria a menor perda de células rápidas e manutenção de maiores valores de velocidade (VCL, VSL e VAP) e do parâmetro ALH observados nesses ejaculados durante a incubação após o descongelamento, visto que a disponibilidade de ATP, essencial à motilidade espermática e batimento flagelar, depende da manutenção da atividade mitocondrial (Zorova et al., 2018).

Além das clusterinas, foi possível identificar a proteína 14-3-3 Zeta/Delta, presente em menor abundância no plasma seminal dos ejaculados de maior resistência espermática ao congelamento-descongelamento. Essa é uma proteína regulatória intracelular que participa de diversos processos celulares, como apoptose, transporte de proteínas, rearranjo do citoesqueleto e metabolismo (Chakrabarti et al., 2007; Han e Haines, 2007). No espermatozoide bovino, essa proteína foi identificada como parte de redes de interação entre proteínas envolvidas em diversos eventos celulares, desde o metabolismo até a reação acrossômica (Puri et al., 2008). As proteínas 14-3-3 medeiam a interação de macromoléculas com as células espermatogênicas durante a espermatogênese (Wong et al., 2008; Sun et al., 2009), além de estarem envolvidas na maturação dos espermatozoides no epidídimo (Huang et al., 2015). Na célula espermática, as proteínas da família 14-3-3 estão localizadas principalmente na peça intermediária e no axonema (Huang et al., 2015), tendo sido associadas ao mecanismo de

motilidade, no qual atuam na regulação da atividade da fosfatase PP1 $\gamma$ 2 (Chakrabarti et al., 2007; Han e Haines, 2007; Fardilha et al., 2011; Huang et al., 2015). A proteína 14-3-3 Zeta/Delta foi também identificada no fluido epididimário de bovinos (Blleannée et al., 2011) e no plasma seminal de búfalos (Brito et al., 2018) e de humanos (Agarwal et al., 2015). Entretanto, as relações entre a abundância dessa proteína no plasma seminal e a função espermática ainda não estão esclarecidas. Recentemente, maior abundância da 14-3-3 Zeta/Delta foi observada no plasma seminal de homens inférteis, no qual foi detectada elevada concentração de EROS. Devido à reduzida qualidade do sêmen *in natura* e ao aumento da abundância de diversas proteínas intracelulares no plasma seminal, a presença da 14-3-3 Zeta/Delta em maior abundância foi associada à ocorrência de apoptose induzida pelas EROS (Agarwal et al., 2015). No presente estudo, no entanto, ambos os grupos de ejaculados, selecionados para a análise proteômica, apresentaram mesma qualidade espermática no sêmen *in natura*. Assim, os resultados apresentados sugerem que a diferença de abundância dessa proteína no plasma seminal esteja relacionada a outros mecanismos celulares, ainda não elucidados. Nesse contexto, é importante ressaltar que o papel das proteínas nos processos celulares varia de acordo com as suas propriedades, as quais são alteradas pela ocorrência das MPTs, que podem modificar a atividade, localização, função e interação com outras proteínas (Walsh et al., 2005; Woodsmith et al., 2013). Dessa forma, a proteína 14-3-3 Zeta/Delta, em maior abundância no plasma seminal dos ejaculados menos resistente ao congelamento, pode apresentar outra função, sendo necessários outros estudos para elucidação da ação dessa proteína no processo de congelamento-descongelamento de espermatozoides de búfalos.

## 7. CONCLUSÃO

Com este estudo, pode-se concluir que:

(i) os espermatozoides de búfalo (*Bubalus bubalis*) apresentaram grande variação, tanto entre indivíduos como entre ejaculados do mesmo indivíduo, na resistência ao processo de congelamento-descongelamento, avaliada pela motilidade total; sendo essa variação principalmente ocasionada pela longevidade dos espermatozoides após o descongelamento;

(ii) os ejaculados com os espermatozoides mais resistentes ao congelamento-descongelamento apresentaram tanto maior sobrevivência espermática ao congelamento quanto maior longevidade após o descongelamento. No entanto, a longevidade após o descongelamento foi a característica mais marcante para diferenciar os ejaculados de maior e menor resistência espermática ao congelamento-descongelamento;

(iii) os ejaculados de maior resistência espermática ao congelamento-descongelamento apresentaram espermatozoides com maior velocidade (células rápidas, VCL, VSL, VAP) no sêmen diluído, imediatamente antes do resfriamento (início do processo de congelamento-descongelamento), o que se manteve após o descongelamento, até o fim do período de incubação (três horas). Durante o período de incubação pós-descongelamento, esses ejaculados foram caracterizados por maior proporção de células rápidas e movimento mais progressivo (motilidade progressiva) e vigoroso (ALH).

(iv) os ejaculados de maior e menor resistência espermática ao congelamento-descongelamento apresentaram diferenças no perfil proteômico do plasma seminal, sendo essas diferenças caracterizadas pela maior intensidade de grande parte dos *spots* no plasma seminal dos ejaculados de maior resistência;

(v) a proteína clusterina apresentou maior abundância no plasma seminal dos ejaculados com os espermatozoides mais resistentes ao congelamento-descongelamento, enquanto a proteína 14-3-3 zeta/delta estava em maior abundância no plasma seminal dos ejaculados com os espermatozoides menos resistentes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; AYAZ, A.; SAMANTA, L. et al. Comparative proteomic network signatures in seminal plasma of infertile men as a function of reactive oxygen species. *Clin. Proteom.*, v. 12, n. 1, art. 23, 2015.
- AHMAD, M.; AHMAD, N.; RIAZ, A.; ANZAR, M. Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. *Reprod. Fertil. Develop.*, v. 27, n. 5, p. 784-793, 2015.
- AHMAD, M.; NASRULLAH, R.; RIAZ, H. et al. Changes in motility, morphology, plasma membrane and acrosome integrity during stages of cryopreservation of buck sperm. *J. South Afr. Vet. Assoc.*, v. 85, n. 1, p. 1-4, 2014.
- ALKMIN, D.V.; PEREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I. et al. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology*, v. 69, p. 203-210, 2014.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* v. 29, n. 3, p. 548-555, 1983.
- ANDRABI, S.M.H. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 44, p. 552-569, 2009.
- ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.G.; CELEGHINI, E.C.C. et al. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology*, v. 77, n. 9, p. 1866-1872, 2012.
- ANZAR, M.; FAROOQ, U.; MIRZA, M.A.; et al. Factors affecting the efficiency of artificial insemination in cattle and buffalo in Punjab, Pakistan. *Pak. Vet. J.*, v. 23, n. 3, p. 106-113, 2003.
- ARANGASAMY, A.; SINGH, L.P.; AHMED, N. et al. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 90, p. 243-254, 2005.
- ASADPOUR, R.; ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; REZAI, S.A.; ANSARI, M.H.K. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 102, p. 308-313, 2007.
- ASSREUY, A.M.S.; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M. et al. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biol. Reprod.*, v. 67, n. 6, p. 1796-1803, 2002.
- AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v. 46, p. 791-797, 1996.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BAILEY, R.; GRISWOLD, M.D. Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 151, n. 1-2, p. 17-23, 1999.

- BAINS, R.; ADEGHE, J.; CARSON, J. Human sperm cells express CD44. *Fertil. Steril.*, v. 78, n. 2, p. 307-312, 2002.
- BAKER, M.A.; REEVES, G.; HETHERINGTON, L. et al. Analysis of proteomic changes associated with sperm capacitation through the combined use of IPG-strip pre-fractionation followed by RP chromatography LC-MS/MS analysis. *Proteomics*, v. 10, n. 3, p. 482-495, 2010.
- BAKER, M. A. Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. *Cell Tissue Res.*, v. 363, n. 1, p. 279-287, 2016.
- BARABÁSI, A.L.; OLTVAI, Z.N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Gen.*, v. 5, n. 2, p. 101-113, 2004.
- BARILE, V.L. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livest. Prod. Sci.*, v. 92, n. 3, p. 183-194, 2005.
- BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T. et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J. Androl.*, v. 26, n. 4, p. 539-549, 2005.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M. et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, v. 63, n. 5, p. 1531-1537, 2000.
- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; JACOMINI, J.O. Eficiência no uso da inseminação artificial em búfalos. *Ver. Bras. Reprod. Anim Supl.* n. 6, p. 104-110, 2009.
- BEATTY, R.A.; STEWART, D.L.; SPOONER, R.L. et al. Evaluation by the heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196 °C on fertility of individual bull semen. *J. Reprod. Fert.*, v. 47, n. 2, p. 377-379, 1976.
- BEDFORD, J.M. The Functions—or Not—of Seminal Plasma?. *Biol. Reprod.*, v. 92, n. 1, p. 1-3, 2015.
- BELLEANNÉE, C.; LABAS, V.; TEIXEIRA-GOMES, A.P. et al. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J. Proteomics*, v. 74, n.1, p. 59-78, 2011.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 71, n. 4, p. 461-470, 2005.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no brasil e no mundo. Perspectivas frente ao agronegócio. In: I Simpósio de ruminantes. UNESP: 02, set. 2010. Anais... p. 1-6.
- BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.*, v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.
- BOE-HANSEN, G.B.; REGO, J.P.A.; CRISP, J.M. et al. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 162, p. 20-30, 2015.
- BORGHESE, A. (ed.). Buffalo Production and Research. In: *Technical Series*, 67 Itália: FAO, 2005.
- BORGHESE, A. Development and perspective of buffalo and buffalo market in Europe and Near East. In: *Proc. 9th World Buffalo Congress*, Buenos Aires. 2010. p. 25-28.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. biochem.*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRITO, M.F. Associação dos fatores bioclimáticos com as características espermáticas pós-descongelamento e com o perfil proteômico do plasma seminal de bubalinos (*Bubalus bubalis*), criados em clima tropical úmido. 2018. 84f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRITO, M. F.; AULER, P.A.; TAVARES, G.C. et al. Label-free proteome of water buffalo (*Bubalus bubalis*) seminal plasma. *Reprod. Domest. Anim., Inpress*: doi: 10.1111/rda.13206

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GARCIA, E.M. et al. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*, v. 70, n. 8, p. 1352-1355., 2008

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; MAYOR, G. et al. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, v. 32, n. 5, p. 505-513, 2009.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GIL, M.A. et al. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro?. *J. Androl.*, v. 25, n. 6, p. 1004-1012, 2004.

CALVETE, J.J.; MANN, K.; SANZ, L. et al. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS lett.*, v. 399, n. 1-2, p. 147-152, 1996.

CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M. et al. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS lett.*, v. 407, n. 2, p. 201-206, 1997.

CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D.; et al. Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.76, n.3, p. 500-506, 2011.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J. et al. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*, v. 74, p. 940-950, 2010.

CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CHAKRABARTI, R.; CHENG, L.; PURI, P. et al. Protein phosphatase PP1 gamma 2 in sperm morphogenesis and epididymal initiation of sperm motility. *Asian J. Androl.*, v. 9, p. 445-452, 2007.

CHAVEIRO, A.; LIU, J.; ENGEL, B. et al. Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*, v. 53, n. 3, p. 349-359, 2006.

CODOGNOTO, V.M. *Perfil proteico do plasma seminal de búfalos (*Bubalus bubalis*) e bovinos (*Bos taurus indicus*)*. 2018. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

D'CRUZ, O.J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. *Front Biosci.*, v. 1, p. 161-176, 1996.

- DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, v. 147, n. 2, p. R27-R42, 2014.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, 1992.
- DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.; MOHAN, G. et al. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology*, v. 46, n. 1, p. 109-120, 1996.
- DOBRINSKI, I. et al. Sperm-oviduct interaction: role of sperm adhesion and effects of sperm cryopreservation. In: 42nd Ann AAEP Conv Proc, p. 144-145, 1996.
- DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L. et al. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v. 375, n. 7, p. 457-462, 1994.
- DRUART, X.; RICKARD, J.P.; MACTIER, S. et al. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J. proteomics*, v. 91, p. 13-22, 2013.
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHÄFER, B.; KIRCHHOFF, C. et al. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 70, n. 1, p. 45-57, 2005.
- ESCH, F.S.; LING, N.C.; BÖHLEN, P. et al. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 113, n. 3, p. 861-867, 1983.
- 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.
- FAOSTAT. 2016. Production: Live animals: buffaloes. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acessado: 15 mai. 2018. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>.
- FARDILHA, M.; ESTEVES, S.L.; KORRODI-GREGORIO, L. et al. Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 17, p. 466-477, 2011.
- FAYE, B.; KONUSPAYEVA, G. The sustainability challenge to the dairy sector – The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *Int. Dairy J.*, v. 24, n. 2, p. 50-56, 2012.
- FRASER, L.R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.A.; BAXENDALE, R.W. et al. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front. Biosci.*, v. 11, p. 1636-1645, 2006.
- GARCIA, E.M.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J. et al. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *J. Androl.*, v. 27, n. 3, p. 434-443, 2006.
- GARCIA, J.C.; DOMINGUEZ, J.C.; PENA, F.J. et al. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: effects on sperm quality and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 119, n. 1-2, p. 160-165, 2010.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, v. 56, n. 1, p.31-40, 2001.

- GAVIRAGHI, A.; PUGLISI, R.; BALDUZZI, D.; et al. Minimum number of spermatozoa per dose in Mediterranean Italian buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed frozen semen and conventional artificial insemination. *Theriogenology*, v. 79, n. 8, p. 1171-1176, 2013.
- GIL, M.A.; ROCA, J.; CREMADES, T. et al. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology*, v. 64, n. 2, p. 305-316, 2005.
- GORDON, I. (ed.). Reproductive technologies in farm animals. USA: CABi, 2017. 331p.
- GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v. 4, p. 3665–3685, 2004.
- GREUBE, A.; MÜLLER, K.; TÖPFER-PETERSEN, E. et al. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry*, v. 40, n. 28, p. 8326-8334, 2001.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol. Reprod.*, v. 75, n. 4, p. 501-507, 2006.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.*, v. 69, n. 3, p. 809-815, 2003.
- HAN, Y.; HAINES, C.J. Role of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility. *Arch. Androl.* v. 53, n. 4, p. 169-77, 2007.
- HARSHAN, H.M.; SANKAR, S.; SINGH, L.P. et al. Identification of PDC-109-like protein (s) in buffalo seminal plasma. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 115, n. 1-4, p. 306-311, 2009.
- HARSHAN, H.M.; SINGH, L.P.; ARANGASAMY, A. et al. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and *in vitro* fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 93, n. 1-2, p. 124-133, 2006.
- HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; CALVETE, J. et al. Cryosurvival and in vitro fertilizing postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl.*, v. 28, n. 5, p. 689-697, 2007a.
- HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; GIL, M.A. et al. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*, v. 67, n. 9, p. 1436-1445, 2007b.
- HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C. et al. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 125, n. 1-4, p. 112-118, 2011.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000a.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, p. 47-58, 2000b.



HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M. et al. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v. 63, n. 2, p. 370-382, 2005.

HOLT, W.V.; PENFOLD, L.M. Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. In: CHENOWETH, P.J.; LORTON, S.P. (Ed.) *Animal Andrology: Theories and applications*. USA: CABi, 2014. p. 76-99.

HUANG, Y. L.; FU, Q.; YANG, L. et al. Differences between high-and low-motility buffalo sperm identified by comparative proteomics. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 50, n. 3, p. 443-451, 2015.

HUMPHREYS, D. T.; CARVER, J. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. et al. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 11, p. 6875-6881, 1999.

IBGE. 2016. Dados da pesquisa pecuária municipal publicados pela Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Acessado: 15 mai. 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>.

IBRAHIM, N. M.; GILBERT, G. R.; LOSETH, K. J. et al. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J. Androl.*, v. 21, n. 6, p. 887-894, 2000.

IBRAHIM, N. M.; TROEDSSON, M. H.; FOSTER, D. N. et al. Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. *J. Androl.*, v. 20, n. 2, p. 230-240, 1999.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v. 61, n. 2-3, p. 255-266, 2004.

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

JONÁKOVÁ, V.; MANÁSKOVÁ, P.; KRAUS, M. et al. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 56, n. 2, p. 275-277, 2000.

JONES, S.E.; JOMARY, C. Clusterin. *Int. J. Bioch. Cell. B.*, 2002, 34.5: 427-431.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J. Androl.*, v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012.

KADIRVEL, G.; PERIASAMY, S.; KUMAR, S. Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) Sperm. *Reprod. Dom. Anim.* V.47, p. 143-150, 2012.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 114, p. 125-134, 2009.

- KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 107, n. 3-4, p. 249-256, 2008.
- KATILA, T.; ANDERSSON, M.; REILAS, T. et al. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.58, p. 241- 244, 2002.
- KELLY, V.C.; KUY, S.; PALMER, D.J.; et al. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics*, v. 6, n. 21, p. 5826-5833, 2006.
- KIRCHHOFF, C.; OSTERHOFF, C.; PERA, I. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia*, v. 30, n. 4-5, p. 225-232, 1998.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.
- KUMAR, V.; HASSAN, M.; KASHAV, T. et al. Heparin-binding proteins of human seminal plasma: purification and characterization. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 75, n. 12, p. 1767-1774, 2008.
- KUMAR, A.; SAXEMA, A.; VERMA, A.K. et al. Hypo-osmotic swelling test on buffalo (Bubalus bubalis) semen. *Buffalo Bulletin*, v. 33, n. 1, p. 111-117, 2014.
- LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* v. 13, n. 5, 368-378, 1992.
- LARSSON, K.; EINARSSON, S. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, v. 17, n. 1, p. 74-82, 1976.
- LAYEK, S.S.; MOHANTY, T.K.; KUMARESAN, A. et al. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 172, p. 1-9, 2016.
- LEAHY, T.; DE GRAAF, S.P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 47, n. s4, p. 207-213, 2012.
- LEDESMA, A.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E.; CANO, A. et al. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 173, p. 35-41, 2016.
- LEDESMA, A.; ZALAZAR, L.; FERNÁNDEZ-ALEGRE, E. et al. Seminal plasma protein modify the distribution of sperm subpopulation in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 184, p. 44-50, 2017.
- LEFEBVRE, R.; CHENOWETH, P.J.; DROST, M. et al. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol. Reprod.*, v. 53, n. 5, p. 1066-1074, 1995.
- LEFEBVRE, R.; SUAREZ, S.S. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.*, v. 54, n. 3, p. 575-582, 1996.
- LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

- LU, Y.; LIAO, Y.; ZHANG, M.; et al. A field study on artificial insemination of swamp and crossbred buffaloes with sexed semen from river buffaloes. *Theriogenology*, v. 84, n. 6, p. 862-867, 2015.
- MACLEOD, G.; VARMUZA, S. The application of proteomic approaches to the study of mammalian spermatogenesis and sperm function. *Febs J.*, v. 280, n. 22, p. 5635-5651, 2013.
- MAGALHÃES, M.J.; MARTINS, L.F.; SENRA, R.L. Differential abundances of four forms of Binder of SPerm 1 in the seminal plasma of Bos taurus indicus bulls with different patterns of semen freezability. *Theriogenology*, v. 86, n. 3, p. 766-777, 2016.
- MAHMOUD, K.G.M.; EL-SOKARY.; ABOU EL-ROOS, M.E.A. et al. Sperm characteristics in cryopreserved buffalo bull semen and field fertility. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, v. 3, n. 4, p. 777-783, 2013.
- MANN, M.; JENSEN, O. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotech.*, v. 21, n. 3, p. 255-261, 2003.
- MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 65, p. 217-228, 2007.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E. et al. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v. 50, n. 1, p. 27-37, 1994.
- MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P.S. et al. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol. Reprod.*, v. 80, n. 3, p. 394-397, 2009.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A<sub>1</sub>, BSP-A<sub>2</sub> and BSP-A<sub>3</sub>) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.*, v. 241, n. 3, p. 685-692, 1987.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, v. 53, p. 109-119, 2002.
- MANN, T. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. 2 ed. Londres: Methuen & CO. LTD, 1964. 493 p.
- MAXWELL, W.M.C.; de GRAAF, S. P.; GHAOUI, R. E. H. et al. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. In: JUENGEL, J. L.; MURRAY, J. F.; SMITH, M. F. *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham: Nottingham University Press, 2007. Cap. 1, p. 13-38.
- MEDRANO, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia*, v. 41, n. 4, p. 246-250, 2009.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.77-78, 1999.
- MENEZES, T.P.; DE CASTRO, M.M.; DO VALE, J.A. et al. Proteomes and morphological features of Calomys tener and Necromys lasiurus (Cricetidae, Sigmodontinae) epididymides. *J. Mammal.*, v. 98, n. 2, p. 579-590, 2017.

- MINGALA, C.N.; VILLANUEVA, M.A.; CRUZ, L.C. River and swamp buffaloes: history, distribution and their characteristics. In: PRESICCE, G.A. (ed). *The Buffalo (Bubalus bubalis)-Production and Research*. Índia: Bentham Science Publishers, 2017. 520p.
- MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Electrophoresis*, v. 19, n. 5, p. 797-801, 1998.
- MOURA, A.A.; MEMILI, E. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Anim. Reprod.*, v. 13, n. 3, p. 191-199, 2016.
- MOURA, A. A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J. Proteomics*, v. 73, n.10, p. 2006-2020, 2010.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 98, n. 3, p.169-188, 2007.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. Androl.*, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; et al. Low density lipoproteins from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- MUGHAL, D.H.; IJAZ, A.; YOUSAF, M.S.; WADOOD, F.; FAROOQ, U. Cryopreservation of buffalo (Bubalus bubalis) semen-limitations and expectations. *Buffalo Bulletin*, v.36, n.1, p. 1-14, 2017.
- MUHAMMAD, A.M.K.; KUMARESAN, A.; SHARMA, V.K. et al. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology*, v. 82, n. 9, p. 1254-1262, 2014.
- MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 43, n. s4, p. 18-31, 2008.
- MÜLLER, P.; ERLEMANN, K.R.; MÜLLER, K. et al. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur. Bioph. J.*, v. 27, n. 1, p. 33-41, 1998.
- MUNGAN, N. A.; MUNGAN, G.; BASAR, M. M. et al. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm motility. *Arch. Androl.*, v. 47, n. 2, p. 113-117, 2001.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.*, v. 63, n. 4, p. 1058-1066, 2000.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v. 9, n. 6, p. 255-62, 1988.
- NAVEENA, B.M.; KIRANT, M. Buffalo meat quality, composition, ad processing characteristics: Contribution to the global economy and nutritional security. *Anim. Front.*, v.4, n.4, p. 18-24, 2014.

- NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.D.; HENRY, M. Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.769-777, 2014.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- OHASHI, O.M.; CORDEIRO, M.S.; MIRANDA, M.S. Biotecnologia da reprodução aplicada a bubalino. *Rev. De Ciênc. Agrar.*, n 45, 2006.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I. et al. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim. Reprod. Sci.*, v. 93, p. 101-113, 2003.
- PIETROBON, E.O.; SORIA, M.; DOMÍNGUEZ, L.A. et al. Simultaneous Activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via g-proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 70, n. 1, p. 58-63, 2005.
- PINI, T.; LEAHY, T.; DE GRAAF, S.P. Seminal plasma and cryopreservation alter ram sperm surface carbohydrates and interactions with neutrophils. *Reprod. Fertil. Develop.*, v. 30, n. 5, p. 689-702, 2018.
- PURI, P.; MYERS, K.; KLINE, D. VIJAYARAGHAVAN, S. Proteomic analysis of bovine sperm YWHA binding partners identify proteins involved in signaling and metabolism. *Biol. Reprod.*, v. 79, n. 6, p. 1183-1191, 2008.
- RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.*, v. 22, n. 2, 2001.
- RATH, D.; WEITZE, K.F.; ALFARO, C.E. et al. Effects of seminal plasma on the number of accessory sperm cells and fertilization in gilts. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 24, n. 3, p. 123-127, 1989.
- REGO, J.P.A.; MOURA, A.A.; NOUWENS, A.S. et al. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 160, p. 126-137, 2015.
- REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M.A. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol. Reprod.*, v. 66, n. 1, p. 159-166, 2002.
- RICKARD, J.P.; LEAHY, T.; SOLEILHAVOUP, C. et al. The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. *J. Proteomics*, v. 126, p. 303-311, 2015.
- RICKARD, J.P.; SCHMIDT, R.E.; MADDISON, J.W. et al. Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. *Reprod. Fert. Develop.*, v. 28, p. 516-523, 2016.
- ROBERTSON, S.A. Seminal plasma and male factor signaling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.*, v. 322, n. 1, 43-52, 2005.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G. et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, v. 84, p. 2692-2699, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; IBORRA, A.; MARTINEZ, P. et al. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 10, n. 6, p. 491-498., 1998.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J. et al. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 66, s. 1, p. 11-22, 2011.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M., MARTINEZ, E.A. et al. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *J. Reprod. Immunol.*, v. 84, n. 1, p. 57-65, 2010.

SABATINI, C.; MARI, G.; MISLEI, B. et al. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus asinus*) spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 49, n. 6, p. 989-994, 2014.

SALEHI, M.; AKBARI, H.; HEIDARI, M. H. et al. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol. Reprod. Develop.*, v. 80, n. 9, p. 718-724, 2013.

SANSONE, G.; NASTRI, M. J. F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, n. 1-3, p. 55-76, 2000.

SARSAIFI, K.; HARON, A. W.; VEJAYAN, J. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. *Theriogenology*, v. 84, n. 6, p. 956-968, 2015.

SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, v. 45, n. 3, p. 633-642, 1996.

SETCHELL, B.P. Semen and its Constituents. In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. *Animal Andrology: Theories and Applications*. CABI, 2014. Cap. 1, p. 3-10.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 28, n. 2, p. 77-84, 1993.

SHELKE, V.B.; DHAMI, A.J. Comparative evaluation of physico-morphological attributes and freezability of semen of gir cattle (*Bos indicus*) and jafarabadi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Indian J Anim Sci*, v. 71, n. 4, p. 319-324, 2001.

SHEN, S.; WANG, J.; LIANG, J. et al. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J. Urol.*, v. 31, n. 6, p. 1395-1401, 2013.

SINGH, I.; BALHARA, A.K. New approaches in buffalo artificial insemination programs with special reference to India. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 194-199, 2016.

SINGH, M.; GHOSH, S.K.; PRASAD, J.K. et al. Heparin binding proteins of buffalo bulls seminal plasma and their relationship with semen freezability. *Ind. J. Anim. Sci.*, v. 83, n. 7, p. 700-704, 2013.

SINGH, M.; GHOSH, S.K.; PRASAD, J.K. et al. Seminal PDC-109 protein vis-à-vis cholesterol content and freezability of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 144, n. 1-2, p. 22-29, 2014.


- SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Reprod. Fertil.*, v. 91, n. 2, p. 567-573, 1991.
- SOUBEYRAND, S.; KHADIR, A.; BRINDLE, Y. et al. Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. *J. Biol. Chem.*, v. 272, n. 1, p. 222-227, 1997.
- SOUZA, F.F.D.; CHIRINEA, V.H.; MARTINS, M.I.M. et al. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 44, s. 2, p. 283-286, 2009.
- SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, S.K.; GHOSH, S.K. et al. Sequestration of PDC-109 protein improves freezability of crossbred bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 131, n. 1-2, p. 54-62, 2012.
- SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, v. 146, n. 1, p. R21-R35, 2013.
- SUN, S.; WONG, E.W.P.; LI, M.W.M.; et al. 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein-protein interactions during spermatogenesis. *J. Endocrinol.*, v. 202, p. 327-336, 2009.
- THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, v. 61, n. 3, p. 590-598, 1999.
- THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, v. 59, n.4, p. 768-776, 1998.
- THURSTON, L.M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A.J. et al. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.*, v. 66, n. 3, 545-554, 2002b.
- THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?. *Cryoletters*, v. 23, p. 255-262, 2002a.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 89, n. 1-4, p. 159-170, 2005.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F. et al. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v. 30, n. 4-5, p. 217-224, 1998.
- VADNAIS, M.L.; KIRKWOOD, R.N.; SPECHER, D.J. et al. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 90, p. 347-354, 2005.
- VAN GESTEL, R.A.; BREWIS, I.A.; ASHTON, P.R. et al. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 13, n. 7, p.445-454, 2007.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.
- VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S. et al. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*, v. 3, n. 2, p. 345-356, 2015.

- VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2003.
- VINSON, G.P.; MEHTA, J.; EVANS, S. Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul. Pept.*, v. 67, n. 2, p. 131-135, 1996.
- WALSH, C.T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G.J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 44, n. 45, p. 7342-7372, 2005.
- WALTHER, T.C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol.*, v. 190, n. 4, p. 491-500, 2010.
- WANAPAT, M.; CHANTHAKHOUN, V. Buffalo production for emerging market as a potential animal protein source for global population. *Buffalo Bull*, v. 34, n. 2, p.169-180, 2015.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60, p. 481-492, 2000.
- WESTFALEWICZ, B.; DIETRICH, M.A.; MOSTEK, A. et al. Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. *J. Dairy Sci.*, v. 100, n. 3, p. 2282-2298, 2017.
- WILKINS, M.R.; SANCHEZ J.C.; GOOLEY, A.A. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, v. 13, p. 19-50, 1995.
- WILSON, M.R.; EASTERBROOK-SMITH, S.B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem. Sci.*, v. 25, n. 3, p. 95-98, 2000.
- WOODSMITH, J.; KAMBUROV, A.; STELZ, U. Dual coordination of post translational modifications in human protein networks. *PLOS Comput. Biol.*, v. 9, n. 3, 2013.
- WONG, E.W.P.; MRUK, D.D.; LEE, W.M. et al. Par3/Par6 polarity complex coordinates apical ectoplasmic specialization and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008. Proceedings... v. 105, n. 28, p. 9657-9652.
- YATES III, J.R. Mass spectrometry: from genomics to proteomics. *Trends Genet.*, v. 16, n. 1, p. 5-8, 2000.
- YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.
- YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A. et al. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, v. 44, p. 62-78, 2002.
- ZHAO, C.; HUO, R.; WANG, F.Q. et al. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil. Steril.*, v. 87, n. 2, p. 436-438, 2007.
- ZOROVA, L.D.; POPKOV, V.A.; PLOTNIKOV, E.J. et al. Functional significance of the mitochondrial membrane potential. *Biochem.* v. 12, n. 1, p.20-26, 2018.



## 9. ANEXOS

### ANEXO I

 <p><b>UFMG</b></p>	<p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b></p> <p><b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p><b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 357 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Desenvolvimento de processos de preservação espermática para maximização do uso da inseminação artificial em búfalos”, que tem como responsável Marc Roger Jean Marie Henry, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado espira-se em 09/12/2020.</p>	
<p><b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 357 / 2015, related to the Project entitled “Development of sperm preservation processes for maximizing the use of artificial insemination in buffaloes”, under the supervision of Marc Roger Jean Marie Henry, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificates expires in 09/12/2020.</p>	
<p>Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 09/12/2015.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a></p>	<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>