



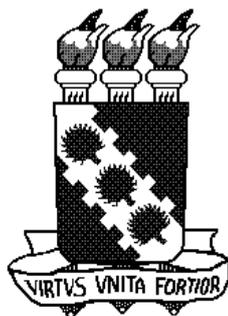
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE
TOUROS *Bos indicus* DAS RAÇAS BRAHMAN E GUZERÁ ASSOCIADAS
COM OS PARÂMETROS SEMINAIS**

JOÃO PAULO ARCELINO DO RÊGO

FORTALEZA-CE

Março/2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE
TOUROS *Bos indicus* DAS RAÇAS BRAHMAN E GUZERÁ ASSOCIADAS
COM OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

**JOÃO PAULO ARCELINO DO RÊGO
ZOOTECNISTA**

FORTALEZA-CE

Março/2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

R267p

Rego, João Paulo Arcelino do.

Proteínas do plasma seminal e das células espermáticas de touros *Bos indicus* das raças Brahman e Guzerá associadas com os parâmetros espermáticos / João Paulo Arcelino do Rego. – 2014. 285 f. : il., color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Nutrição e produção animal.

Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura.

Coorientação: Dr. Jorge André Matias Martins.

1. Bovino - Raças. 2. Gado - Reprodução. 3. Criopreservação. I. Bovino de leite.

CDD 636.08

JOÃO PAULO ARCELINO DO RÊGO

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS *Bos indicus* DAS RAÇAS BRAHMAN E GUZERÁ ASSOCIADAS COM OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura

Co-Orientador: Dr. Jorge André Matias Martins

Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura (UFC)

Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim (UFRGS)

Dr. Renato Azevedo Moreira (UNIFOR/UFC)

Dra. Maria Gorete Flores Salles (UNILAB)

Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva (UECE)

Dr. Diônes Oliveira Santos (Embrapa Caprinos e Ovinos)

**Fortaleza-CE
Março/2014**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOÃO PAULO ARCELINO DO RÊGO – Nasceu na cidade de Quixeramobim, Estado do Ceará aos 02 de setembro de 1982. Recebeu o título de Bacharel em Zootecnia pela Universidade Estadual Vale do Acaraú em janeiro de 2008. Em fevereiro do mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área: Reprodução Animal) da Universidade Federal do Ceará. Desenvolveu trabalhos na área de proteoma do plasma seminal de ovinos deslanados e em março de 2010 recebeu o título de Mestre em Zootecnia. No mesmo mês e ano ingressou no Doutorado Integrado em Zootecnia UFC/UFRPE/UFPB (Área: Manejo Produtivo e Reprodutivo Animal). No ano de 2012 foi recebido como estudante de PhD na Universidade de Queensland, Austrália onde desenvolveu pesquisas com bovinos da raça Brahman utilizando abordagem proteômica na busca de marcadores moleculares da fertilidade no macho. Desenvolveu ainda, atividades nas áreas de andrologia e tecnologia de sêmen, inseminação artificial e diagnóstico de gestação por imagem, fertilização e produção *in vitro* de embriões bovinos.

EPIGRAFE

**“É preciso aprender com a prática, pois, embora você pense
que sabe, só terá certeza depois que experimentar”**

Sófocles

Aos meus avôs João Arcelino do Rêgo (João Baia) e Francisco Arcelino do Rêgo (Chico Baia) *in memoriam*, pelas maiores das heranças que me foram deixadas, a perseverança, a honestidade, senso de justiça e a humildade, riquezas essenciais para minha formação como Ser Humano.

OFEREÇO

Aos meus pais Gessé e Francisca símbolos de honestidade, superação presentes em toda minha caminhada e pelo apoio para superar e transpor as dificuldades que ocorreram durante mais uma conquista.

Pai e Mãe... Vocês fizeram parte dessa história!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fonte de inspiração e fortaleza principalmente na superação dos momentos mais difíceis desta trajetória.

À minha família, em especial aos meus Pais (Francisca e Gessé) e minha irmã (Ana Jussara), ao meu cunhado Wagner, ao meu sobrinho e afilhado Arthur por estarem sempre presentes durante toda a minha trajetória profissional, pela compreensão e carinho nos momentos de ausência; por todo alicerce que uma pessoa precisa para transpor os obstáculos.

À minha namorada, amiga e companheira Viviane, pelo apoio incondicional durante as dificuldades; pela compreensão nos momentos em que eu estava distante e pelos momentos de impaciência.

Aos meus sogros Vera Abreu e Osvaldo Araújo, por todo carinho e atenção com que me acolheram na sua casa nos dias que antecederam a conclusão deste trabalho e por sempre terem me tratado como filho.

À minha prima-irmã e amiga Cirlânia, por ter me acolhido em sua casa dando todas as condições para que eu desenvolvesse meus estudos durante todo esse tempo.

Ao meu orientador Prof. Arlindo Alencar Araripe Moura, por esses seis anos de ensinamentos profissionais e, principalmente pelos ensinamentos de vida que me foram passados; pelas oportunidades de estudo e trabalho aqui no Brasil, nos Estados Unidos e na Austrália; por ter dado as condições essenciais (suporte financeiro, estrutura de laboratório e equipe) para a realização dos experimentos e pelos momentos de descontração e lazer na Fazenda Condado

Ao meu co-orientador Jorge Martins, por todo empenho na condução dos trabalhos, pela disponibilidade de enfrentar com nossa equipe todas as fases difíceis do trabalho e principalmente por enfrentar vários momentos de extrema aventura nos caminhos de Quixeramobim.

À Fazenda Canhotinho do Grupo JMacedo, em especial aos amigos Wanderlly, Vavá, Fransquinho, Manoel, Tafarel e Igor pela disponibilidade de toda infra-estrutura da Fazenda para a realização do experimento, pelo empenho e dedicação durante os 9 meses de coleta das amostras.

À Universidade de Queensland, em especial aos meus orientadores no exterior, Dr. Michael McGowan e Dra. Gry Boe-Hansen por todo empenho, disponibilidade e ensinamentos repassados durante a condução dos experimentos.

À Escola de Química e Biociências Moleculares da Universidade de Queensland, em especial à Dra. Amanda Nouwens que não mediu esforços para oferecer o melhor treinamento durante e execução das análises proteômicas.

Ao Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation – CSIRO, em especial à Dra. Yutao, Bronwyn, Dr. Emanuel, Dra. Ala, Dr. Rodrigo pelas informações repassadas, análises realizadas e pelo carinho com que me receberam durante os trabalhos no Campus da UQ de St. Lucia, Brisbane.

Aos amigos Alessanda Watanabe, Diego Cornejo, Rosabel, Juan, Dom Eduardo, e em especial minha querida Sophia, por terem me recebido como se fosse um membro da família durante minha estadia em terras distantes.

Aos amigos do campus da Universidade de Queensland em Gatton, Austrália, Marina Fortes, Laércio Porto, Tiago Corrêa, Lauro Sagrilo, Eko Pranoto, Jigme Tenzin, Dra. Sophia Edwards, Dra. Lisa Kidd, por toda contribuição na condução dos experimentos, ensinamentos repassados e pela paciência com o idioma.

À toda equipe da Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da UFC.

À banca examinadora pela atenção dispensada na correção deste trabalho.

A todas as pessoas que estiveram comigo em mais uma conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFC pela formação durante esse curso.

Ao Programa Ciências sem Fronteiras/CNPq pela bolsa de sanduíche na Austrália.

Ao meu Quixeramobim:

As marcas do tempo e do homem
Estão nas águas do rio faceiro
Nas escritas rupestres também
Na eterna sombra do Conselheiro
Na alma do Santo Antônio padroeiro

No aboio contrito do vaqueiro
Vagando pelas matas, noites a fio
No gemido do escravo no terreiro
Nas congadas, rezas e danças do estio
A remoer dor, alegria, calor e frio

No brilho das pedras e gemas tão belas
No mormaço das tardes de setembro daqui
No sino das centenárias igrejas e capelas
No ar juvenil do sopro alegre do “aracati”
Na saudade que eu tenho de ti

Na bravura do teu povo gentil e hospitaleiro
A palomilhar sua estrada com raça e coragem
Com a certeza filial do Deus verdadeiro
Sem temer qualquer desafio nessa viagem
Com a certeza de garantir sua boa imagem

Quixeramobim, meu amor infinito
Quixeramobim, meu poema mais bonito

Joaquim Pontes Brito

SUMÁRIO

Página

Considerações iniciais	23
------------------------------	----

CAPÍTULO I

Proteínas do plasma seminal e congelabilidade do sêmen - Revisão Bibliográfica.....	25
---	----

<i>Proteínas do plasma seminal e de espermatozoides como marcadores moleculares da fertilidade em ruminantes</i>	26
--	----

<i>Proteínas envolvidas em eventos associados à maturação e a proteção das células espermáticas.....</i>	27
--	----

<i>Proteínas associadas à motilidade espermática</i>	31
--	----

<i>Proteínas envolvidas na capacitação espermática</i>	32
--	----

<i>Proteínas envolvidas na reação acrossômica e fertilização</i>	33
--	----

<i>Criopreservação do sêmen</i>	37
---------------------------------------	----

<i>Meios e aditivos utilizados para a criopreservação de espermatozoides bovinos.....</i>	42
---	----

<i>Considerações finais.....</i>	44
----------------------------------	----

<i>Referências.....</i>	45
-------------------------	----

CAPÍTULO II

Proteínas do plasma seminal e suas associações com a porcentagem de espermatozoides normais de touros <i>Bos indicus</i> da raça Brahman.....	67
---	----

Resumo	68
--------------	----

Abstract.....	69
---------------	----

Introdução.....	70
-----------------	----

Material e Métodos.....	72
-------------------------	----

<i>Animais, coleta e análise das amostras de sêmen</i>	72
--	----

<i>Determinação da concentração de proteínas no plasma seminal</i>	73
--	----

<i>Eletroforese bidimensional</i>	74
<i>Coloração dos géis</i>	75
<i>Análises das imagens dos géis pelo aplicativo PDQuest</i>	75
<i>Digestão trípica das proteínas e limpeza das amostras (Zip-tip clean up)</i>	75
<i>Identificação das proteínas utilizando espectrometria de massas e busca de dados</i>	
<i>Matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-ToF)</i>	77
<i>Electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-qTOFMS)</i>	77
<i>Ontologia gênica</i>	78
<i>Análise de interações entre proteínas</i>	78
<i>Análise estatística</i>	79
<i>Validação da identidade dos spots associados com a porcentagem de espermatozoides normais</i>	80
Resultados	80
<i>Parâmetros seminais</i>	80
<i>Identificação das proteínas do plasma seminal e bioinformática</i>	82
<i>Associações entre as proteínas do plasma seminal e a porcentagem de espermatozoides normais aos 24 meses de idade</i>	87
<i>Análise de regressão múltipla</i>	87
Discussão	90
<i>Principais proteínas do plasma seminal</i>	90
<i>Proteínas associadas com a maturação e proteção espermática</i>	92
<i>Proteínas envolvidas na regulação da proteólise e glicólise</i>	98
<i>Proteínas envolvidas na capacitação espermática e reação acrossômica</i>	101
<i>Proteínas associadas com a interação entre gametas</i>	103
Considerações finais	105

Referências.....	106
CAPÍTULO III	
Perfil proteico do plasma seminal obtido por vagina artificial interna e eletroejaculação de touros da raça Brahman	135
Resumo	136
Abstract	137
Introdução.....	138
Material e Métodos.....	139
<i>Animais</i>	<i>139</i>
<i>Vagina artificial interna(VAI)</i>	<i>140</i>
<i>Eletroejaculação.....</i>	<i>142</i>
<i>Avaliação dos parâmetros seminais.....</i>	<i>142</i>
<i>Eletroforese bidimensional em gel diferencial (DIGE)</i>	<i>143</i>
<i>Coloração do gel com Coomassie blue G-250.....</i>	<i>146</i>
<i>Digestão tríplica das proteínas e limpeza das amostras (Zip-tip clean up).....</i>	<i>146</i>
<i>Identificação das proteínas utilizando espectrometria de massas (TripleToF-MS) e busca de dados</i>	<i>147</i>
Resultados	148
<i>Parâmetros seminais</i>	<i>148</i>
<i>Proteínas do plasma seminal</i>	<i>149</i>
Discussão	153
<i>Proteínas diferencialmente expressas nos mapas bidimensionais do plasma seminal de amostras coletadas por vagina artificial interna</i>	<i>154</i>
<i>Proteínas diferencialmente expressas nos mapas bidimensionais do plasma seminal de amostras coletadas por eletroejaculação</i>	<i>158</i>
Considerações Finais.....	162

Referências	162
CAPÍTULO IV	
Proteínas do plasma seminal e das células espermáticas associadas com a congelabilidade do sêmen de touros <i>Bos indicus</i> da raça Guzerá.....	178
Resumo	179
Abstract	180
Introdução.....	182
Material e Métodos.....	183
<i>Coleta de sêmen e análises pré-criopreservação</i>	<i>183</i>
<i>Avaliação do sêmen pós-criopreservação</i>	<i>185</i>
<i>Teste hiposmótico (HOST).....</i>	<i>186</i>
<i>Análise proteômica do plasma seminal e dos espermatozoides</i>	<i>186</i>
<i>Extração da proteína total dos espermatozoides</i>	<i>186</i>
<i>Proteínas do plasma seminal</i>	<i>188</i>
<i>Coloração dos géis com Coomassie blue G-250.....</i>	<i>189</i>
<i>Análises das imagens dos géis pelo aplicativo PDQuest.....</i>	<i>189</i>
<i>Identificação das proteínas por electrospray ionization quadrupole-time-of-flight (ESI-Q-ToF) mass spectrometry</i>	<i>189</i>
<i>Análise das interações proteína-proteína</i>	<i>191</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>192</i>
Resultados.....	193
<i>Características e parâmetros seminais dos touros com alta e baixa congelabilidade do sêmen</i>	<i>193</i>
<i>Proteínas do plasma seminal e espermáticas</i>	<i>195</i>
<i>Modelos de regressão</i>	<i>200</i>
<i>Interações proteína-proteína.....</i>	<i>200</i>

<i>Proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides identificadas nos spots</i>	
<i>marcadores de diferentes regiões dos géis.....</i>	205
Discussão	205
Considerações Finais.....	217
Referências.....	218

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO II

- TABELA 1.** Peso corporal, circunferência escrotal, parâmetros espermáticos e proteína total no plasma seminal dos touros *Bos indicus* aos 24 meses de idade (média \pm EP)..... **81**
- TABELA 2.** Proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (MALDI-TOF e ESI-qTOFMS). **117**
- TABELA 3.** *Spots* proteicos do plasma seminal (transformados por Log) e outros fatores identificados pelo modelo de regressão múltipla com *step-wise* e os seus efeitos sobre a porcentagem de espermatozoides normais em touros Brahman aos 24 meses de idade (PEN24). **89**
- TABELA 4.** Proteínas do plasma seminal d touros *Bos indicus* associadas com a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais aos 24 meses de idade (PEN24)..... **132**

CAPÍTULO III

- TABELA 1.** Parâmetros seminais (medias \pm EP) associadas a amostras de sêmen de touros *Bos indicus* coletados por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ)..... **150**
- TABELA 2.** Proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* identificadas por eletroforese bidimensional em gel diferencial (DIGE) e espectrometria de massas (TripleToF-MS). (A) Representa as proteínas diferentemente expressas em amostras de sêmen coletadas por vagina artificial interna (VAI). (B) Representa as proteínas diferentemente expressas em amostras de sêmen coletadas por eletroejaculação (EEJ)..... **169**

CAPÍTULO IV

TABELA 1. Características ponderais e de sêmen pré-criopreservação (média \pm EPM) em grupos de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen.....**194**

TABELA 2. Características seminais pós-criopreservação (média \pm EPM), avaliadas pelo CASA, de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen.**195**

TABELA 3. Proteínas do plasma seminal de touros Guzerá. As proteínas representam aquelas identificadas nos *spots* diferencialmente expressos e associadas aos parâmetros seminais pós-criopreservação nos grupos de alta e baixa congelabilidade e aquelas identificadas nos *spots* marcadores de diferentes regiões dos géis 2-D.....**225**

TABELA 3. Proteínas totais dos espermatozoides de touros Guzerá. As proteínas representam aquelas identificadas nos *spots* diferencialmente expressos e associados aos parâmetros seminais pós-criopreservação nos grupos de alta e baixa congelabilidade e aquelas identificadas nos *spots* marcadores de diferentes regiões dos géis 2-D.....**238**

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

FIGURA 1. O mecanismo de proteção dos espermatozoides conferido pela lipoproteína de baixa densidade da gema do ovo proposto por (Manjunath et al., 2002). 41

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Distribuição dos touros Brahman selecionados aos 24 meses (n= 56) diante do grupo original de touros (n= 109), em categorias de porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (PEN24).. 81

FIGURA 2. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus*. 84

FIGURA 3. Anotações da ontologia gênica do proteoma do plasma seminal de touros *Bos indicus* em função do processo biológico. 85

FIGURA 4. Análise in-silico da interação de proteínas. As proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* foram analisadas por meio de interações proteínas-proteína com o aplicativo STRING. 86

FIGURA 5. *Tree model* com as transformações Log mostrando as relações entre os 6 spots proteicos do plasma seminal (SPPs) e porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais aos 24 meses de idade (PEN24) em touros *Bos indicus* da raça Brahman. 87

FIGURA 6. *Smoothers* não-paramétricos do modelo *GAM*, mostrando a relação entre a porcentagem de espermatozoides normais aos 24 meses

(PEN24) e 6 <i>spots</i> proteicos do plasma seminal (transformação em Log) do <i>Tree models</i> ..	88
--	----

FIGURA SUPLEMENTAR 1. Mapas bidimensionais do plasma seminal de touros <i>Bos indicus</i> . Os géis representam os membros do <i>match set</i> com os principais <i>spots</i> adicionados no gel <i>máster</i> ...	134
---	-----

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Componentes da vaginal artificial interna utilizada em vacas.....	142
--	-----

FIGURA 2. Marcação e pareamento das proteínas do plasma seminal provenientes de amostras de sêmen coletadas por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ).....	145
--	-----

FIGURA 3. Perfil proteômico do plasma seminal de touros <i>Bos indicus</i> coletados por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ).....	152
---	-----

FIGURA 4. Spots diferencialmente ($p < 0,05$) expressos no plasma seminal de touros <i>Bos indicus</i> (médias \pm EP) coletados por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ)..	153
--	-----

CAPÍTULO IV

FIGURA 1. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros Guzerá gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, USA), baseado no <i>match set</i> com todos os 13 géis utilizados no estudo.....	197
--	-----

FIGURA 2. Spots diferencialmente expressos nos mapas 2-D do plasma seminal de touros Guzerá (médias \pm EPM) com alta e baixa congelabilidade do sêmen.....	198
FIGURA 3. Mapa bidimensional das proteínas dos espermatozoides de touros Guzerá gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, USA), baseado no <i>match set</i> com todos os 13 géis utilizados no estudo.....	199
FIGURA 4. <i>Spots</i> diferencialmente expressos nos mapas 2-D dos espermatozoides de touros Guzerá (médias \pm EP) com alta e baixa congelabilidade do sêmen.....	200
FIGURA 5. Modelos de regressão linear dos parâmetros seminais pós-criopreservação em função das proteínas do plasma seminal... ..	202
FIGURA 6. Análise das interações biológicas das proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides de touros Guzerá associadas com a congelabilidade do sêmen utilizando o aplicativo MetaCore (Figura 5).. ..	203

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E DAS CÉLULAS
ESPERMÁTICAS DE TOUROS *Bos indicus* DAS RAÇAS BRAHMAN E
GUZERÁ ASSOCIADAS COM OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

RESUMO GERAL – O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo sobre as proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides e suas associações com morfologia espermática e com métodos de coleta e criopreservação de sêmen de touros *Bos indicus* das raças Brahman e Guzerá, utilizando uma abordagem proteômica. Foram coletadas amostras de sêmen e as proteínas do plasma seminal foram separadas através de eletroforese bidimensional ou eletroforese bidimensional em gel diferencial e identificadas por espectrometria de massa. O proteoma do plasma seminal dos touros *Bos indicus* foi descrito identificando as *Binder of sperm proteins* como as proteínas mais abundantes no fluido seminal, enquanto que as *spermadhesins* formaram o segundo grupo com maior expressão. Foram encontradas associações positivas e negativas entre as proteínas do plasma seminal e a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais constituindo possíveis marcadores moleculares desta característica. Em outro aspecto, foram identificadas diferenças no volume do ejaculado e no perfil proteico do plasma seminal touros *Bos indicus* submetidos a diferentes métodos de coleta de sêmen (vagina artificial interna e eletroejaculação). Baseado nas análises dos géis bidimensionais, 22 *spots* tiveram volumes maiores nas amostras coletadas por vagina artificial interna, correspondendo a 21 proteínas. Em contrapartida, 33 *spots* correspondendo a 26 proteínas tiveram maiores volumes nos géis de amostras coletadas por eletroejaculação. As principais proteínas com maior expressão em amostras obtidas por vagina artificial interna e eletroejaculação eram de origem epididimária e das glândulas sexuais acessórias, respectivamente. No presente trabalho, ainda foram feitas associações entre a expressão de proteínas no plasma seminal e nas

células espermáticas com os parâmetros do sêmen pós-criopreservação em touros *Bos indicus* da raça Guzerá. Os animais apresentaram, em média, peso corporal, circunferência escrotal e parâmetros seminais pré-criopreservação do sêmen sem diferença estatística. De acordo com os parâmetros espermáticos pós-criopreservação obtidos pelo sistema computadorizado de análise de sêmen os animais foram divididos em grupos de alta e baixa congelabilidade. Três proteínas do plasma seminal e cinco dos espermatozoides foram mais expressas no grupo de alta congelabilidade. Outras seis proteínas do plasma seminal foram mais expressas no grupo de baixa congelabilidade. Os modelos de regressão adotados para as intensidades dos *spots* do plasma seminal e das células espermáticas, bem como as análises de interações proteína-proteína indicam que a maioria das proteínas inversamente associadas com a viabilidade espermática pós-descongelação pode ser expressa como uma resposta a um estresse oxidativo e/ou ataque microbiano antes da criopreservação de sêmen de animais do grupo de baixa congelabilidade não detectado pelas análises convencionais do sêmen. Através da utilização de uma abordagem proteômica, os resultados encontrados no presente trabalho podem servir de orientação para futuras pesquisas que visem identificar marcadores moleculares de processos reprodutivos baseado na expressão de proteínas no plasma seminal e nas células espermáticas de touros *Bos indicus*.

Palavras-chave: proteoma, espermatozoide, eletroforese, sêmen

**SEMINAL PLASMA AND WHOLE SPERM PROTEINS FROM *Bos indicus*
BULLS AND ITS ASSOCIATION WITH SPERMATICS PARAMETERS**

ABSTRACT – The aim of this work was to study seminal plasma and whole sperm proteins and their association with sperm morphology and methods of semen collection and cryopreservation in *Bos indicus* bulls using a proteomics approach . Seminal plasma proteins were separated by two-dimensional electrophoresis or differential gel electrophoresis and identified by mass spectrometry gel. Firstly, we described the seminal plasma proteome of *Bos indicus* bulls, identified the Binder of Sperm Proteins as the more abundant proteins in seminal fluid, while the spermadhesins formed the second group with higher expression. Positive and negative associations were found between seminal plasma proteins and the percentage of morphologically normal spermatozoa constituting possible molecular markers of this characteristic. In other hand, differences were identified in ejaculate volume and seminal plasma protein profile of *Bos indicus* bulls subjected to different methods of semen collection (internal artificial vagina and electroejaculation). Based on the analysis of two-dimensional gels, 22 spots had larger volumes in samples collected by internal artificial vagina, corresponding to 21 proteins. In contrast, 33 spots had larger volumes of samples collected by electroejaculation corresponding to 26 different proteins. The proteins with great volume in samples obtained by internal artificial vagina and electroejaculation had epididymal and accessory sex glands origin, respectively. In the present study, others associations have been made among protein expression in seminal plasma and sperm cells and semen parameters after cryopreservation in *Bos indicus* bulls. The animals had not differences between body weight, scrotal circumference and seminal parameters pre-freezing. After cryopreservation, the semen parameters were analyzed by computer

system (CASA) and the animals were divided into groups of low and high freezability. In the high freezability group were more expressed three proteins of seminal plasma and five proteins of sperm. For the group of low freezability were more expressed six different seminal plasma proteins. Regression models adopted for the intensities of the spots in the seminal plasma and sperm cells, as well as analysis of protein-protein interactions, indicate that most of the proteins inversely associated with post -thaw sperm viability may be expressed as a response to an oxidative stress and/or microbial attack before the semen cryopreservation of animals with low freezability. These parameters could not be detected by conventional sperm analysis. This results obtained by applying of the proteomics approach, could serve as guideline for future researchs aimed to identified molecular markers of reproductive processes based on the expression of proteins in seminal plasma and sperm cells of *Bos indicus* bulls.

Key-words: proteome, espermatozoa, electrophoresis, semen

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A pecuária de corte estabelecida em regiões tropicais dos continentes é fundamentada na utilização de genótipos adaptados às condições de clima e temperatura. O destaque é para animais de origem zebuína ou ainda raças com grandes proporções de genes de animais *Bos indicus*, tidas como sintéticas que foram desenvolvidas com intuito de inserir genes relacionados às características de adaptação. Estas características adaptativas dos *Bos taurus indicus* diferem quanto aos animais da subespécie *Bos taurus taurus* principalmente no metabolismo, na forma como utilizam o alimento e a água, na quantidade e no tamanho das glândulas sudoríparas, características de pele e pelame e na libido, fato que reflete uma provável adaptação dos animais *Bos indicus* a um ambiente com adversidades de alimentação e temperatura. Apesar da importância dos animais *Bos indicus* para os sistemas de produção de corte, no Brasil e em outras regiões do mundo, ainda são escassas as informações básicas sobre a fisiologia reprodutiva dos reprodutores.

A eficiência reprodutiva, nos atuais sistemas de produção, é um fator essencial a ser considerado para que haja retorno econômico satisfatório da atividade. A disponibilidade de reprodutores testados, com elevado potencial reprodutivo é o alicerce que garante a redução do intervalo entre gerações, o que resulta em maiores ganhos genéticos anuais. Dessa forma, a busca por indicadores da fertilidade masculina tem sido alvo de diversos estudos conduzidos nas últimas décadas. Diante da abordagem sobre marcadores moleculares dos processos reprodutivos, diversos critérios têm sido utilizados para buscar indicadores confiáveis do potencial reprodutivo dos animais, como avaliações da estrutura da cromatina e integridade do DNA, identificação de transcritos nos espermatozoides, identificação de proteínas de membrana, além das proteínas expressas nos fluidos do trato reprodutivo.

Nesse contexto, o conhecimento do perfil proteico do sêmen de touros *Bos indicus* poderá alicerçar os estudos sobre a fisiologia reprodutiva básica desses animais, utilizando uma abordagem proteômica, é possível o desenvolvimento de estratégias para identificar marcadores moleculares da precocidade sexual e fertilidade em reprodutores. Portanto, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo sobre as proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides e suas associações com morfologia espermática e com métodos de coleta e criopreservação de sêmen de touros *Bos indicus* das raças Brahman e Guzerá, utilizando uma abordagem proteômica.

CAPÍTULO I
PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E CONGELABILIDADE DO
SÊMEN
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Proteínas do plasma seminal e congelabilidade do sêmen

A eficiência reprodutiva, como objetivo de seleção, constitui uma importante parcela inserida nos índices utilizados nos atuais programas de melhoramento genético por ser um dos fatores essenciais para a lucratividade. Quando esse objetivo é utilizado na seleção de reprodutores, a frequência de genes de interesse aumenta consideravelmente no rebanho, uma vez que são através dos touros considerados superiores que todo o potencial genético é introduzido no plantel. Estima-se que atualmente existe um “déficit” anual no Brasil de mais de 200 mil touros registrados para serem utilizados em sistemas de acasalamentos. Neste contexto, buscar testes capazes prever o potencial reprodutivo dos animais considerados melhoradores de forma precoce é uma alternativa capaz de reduzir este “déficit”.

Proteínas do plasma seminal e de espermatozoides como marcadores moleculares da fertilidade em ruminantes

Os testes hoje estabelecidos para a seleção de reprodutores pouco consideram a hipótese de que “componentes moleculares dos espermatozoides, e/ou dos meios que os cercam, podem influenciar a capacidade fecundante destas células” (MOURA et al., 2011). Em linhas gerais e, em acordo com esta premissa, testes cuja base de avaliação é restrita a parâmetros de cinética e morfologia espermática ainda apresentam limitada relação com os índices de fertilidade in vivo e a razão desta observância deve-se ao fato de que estas avaliações não explicam ou avaliam todas as modificações funcionais ocorridas no espermatozoide pós-ejaculação ou quando submetidos ao processo de resfriamento ou congelamento (KILLIAN et al., 1993; MOURA, 2005; MOURA et al., 2006a; MOURA et al., 2006b; MOURA et al., 2010).

A função espermática após a espermatogênese é regulada de forma significativa por componentes que integram o fluido do trato reprodutivo, composto por secreções testiculares, epididimárias e das glândulas sexuais acessórias que, quando combinados após a ejaculação,

formam o plasma seminal. Dentre estes componentes, as proteínas presente no plasma seminal possuem papel fundamental dado que atuam no remodelamento de membrana durante a maturação espermática (DACHEUX et al., 2009), proteção espermática contra o estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2005), capacitação espermática, interação entre gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (MOURA et al., 2006a; MOURA et al., 2006b; MOURA et al., 2007a; MOURA et al., 2007b; SOUZA et al., 2008; LIU; XIE, 2012). A utilização de uma abordagem baseada no estudo das proteínas seminais, ou mesmo dos fluidos do trato reprodutivo, constitui uma importante ferramenta para o desenvolvimento de estratégias para identificar marcadores moleculares da precocidade sexual e fertilidade em reprodutores.

Proteínas envolvidas em eventos associados à maturação e a proteção das células espermáticas

Após a espermatogênese, as células espermáticas são incapazes de fertilizar oócitos, sendo necessárias transformações bioquímicas e estruturais intra e extracelulares para a aquisição dessa capacidade fecundante. No processo de maturação espermática ocorrido durante o trânsito epididimário, os espermatozoides adquirem motilidade progressiva, capacidade de ligação à zona pelúcida e capacidade de fertilização e sobrevivência embrionária (HINTON et al., 1996; DACHEUX et al., 2003; GATTI ET al., 2004; DACHEUX et al., 2005; BELLEANNEE et al., 2011). O processo de maturação espermática que envolve, além do remodelamento da membrana plasmática, uma série de transformações no metabolismo do espermatozoide é mediado por diversas proteínas presentes no fluido epididimário e que estão presentes no plasma seminal (GATTI et al., 2004; DACHEUX et al., 2006).

A capacidade do espermatozoide em adquirir motilidade, bem como reconhecer o oócito é dependente das modificações que ocorrem nestas células durante o trânsito no

ambiente epididimário (GATTI et al., 2004). Proteases e seus inibidores constituem uma importante fração dos componentes proteicos do fluido do epidídimo e estão associadas com mudanças estruturais no espermatozoide, principalmente no remodelamento da membrana plasmática (MOURA et al., 2010). A *epididymal secretory protein E1* constitui o principal componente proteico do fluido do epidídimo de touros da raça holandesa e esta proteína contém alto grau de glicosilação e, como principal função molecular, a de ligação (KIRCHHOFF et al., 1996; KIRCHHOFF et al., 1998; MOURA et al., 2010). Esta proteína é sintetizada pelo epitélio do epidídimo, liberada a partir da superfície apical das células epiteliais e secretada para o lúmen, onde interage com a superfície dos espermatozoides atuando no remodelamento da membrana plasmática (KIRCHHOFF et al., 1996; KIRCHHOFF et al., 1998). As proteases, quando associadas à ubiquitina, um pequeno peptídeo de 8,5 kDa presente no fluido do epidídimo, se ligam à superfície de espermatozoides com defeitos de cabeça, de acrossôma e de peça intermediária funcionando como marcadores para a remoção destas células por fagocitose, nas células epiteliais dos ductos eferentes, e por macrófagos intra-epiteliais na cauda do epidídimo (SUTOVSKY, 2003; CORNWALL, 2009).

O epitélio epididimário secreta de forma apócrina diversas proteínas que possuem origem nos exomos do epitélio epididimário chamados epididimossomos. Diversas dessas proteínas como *aldose-reductase* e *sorbitol dehydrogenase* desempenham papel fundamental na maturação espermática por desencadarem eventos que envolvem fosforilação, passo requerido para que as células espermáticas adquiram motilidade (SULLIVAN et al., 2005; SULLIVAN et al., 2007). De forma similar, a *Zinc-alpha-2-glycoprotein (ZAG-2)* é uma proteína multifuncional encontrada na saliva, leite, líquido amniótico e plasma seminal (TADA et al., 1991; SANCHEZ et al., 1997). A ZAG-2 atua na maturação espermática por interagir com fosfolipídios da membrana presentes na região equatorial e peça intermediária do espermatozoide (JONES, 1998; DING et al., 2007) e regula a iniciação da motilidade

progressiva pela ativação do AMP cíclico e sinalização através da proteína kinase A (DING et al., 2007; QU et al., 2007).

Outro grupo de proteínas presentes no fluido do epidídimo e que participam do processo de maturação espermática são as enzimas glicolíticas como a *alpha enolase*, *aldehyde-reductase*, *alpha-fucosidase*, *acetyl-beta-glucosaminidase* e *beta-galactosidase* (MOURA et al., 2010). Estas enzimas atuam hidrolisando porções de açúcares presentes em glicoproteínas da membrana espermática durante a maturação e potencialmente estão envolvidas na interação entre gametas no momento da fertilização (TULSIANI et al., 1995; ABASCAL et al., 1998; TULSIANI et al., 1998).

O fluido do epidídimo contém proteínas que participam de processos relacionados à proteção dos espermatozoides, principalmente contra o estresse oxidativo, efeitos citotóxicos da precipitação proteica e ataque do sistema imune (HINTON et al., 1996; KRAUS et al., 2005). A formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) é inerente ao metabolismo espermático e influencia diferentes aspectos da fisiologia do espermatozoide (DE LAMIRANDE et al., 1997). Porém, quando um desequilíbrio ocorre na formação de ROS, por redução de enzimas reguladoras do influxo de cálcio na membrana e dos processos oxidativos, tais componentes podem causar uma série de danos às células espermáticas, causando reduções significativas na fertilidade (OHTA et al., 1989; AITKEN et al., 1993; NICHI et al., 2006). Enzimas reguladoras dos processos oxidativos como a *glutathione s-transferase*, *tiorredoxina peroxidase*, *superoxide dismutase*, *glutathione peroxidase* e *catalase* são secretadas no fluido do epidídimo de várias espécies e constituem um verdadeiro arsenal para combater os efeitos deletérios das ROS (ALVAREZ; STOREY, 1995; FOUCHECOURT et al., 2000; DACHEUX et al., 2006). A *glutathione peroxidase* (*GSHPx*) é um dos principais meios enzimáticos de proteção espermática e encontra-se presente no epidídimo e espermatozoide de diversas espécies (PERRY et al., 1992; DACHEUX et al., 2005). A *GSHPx* age utilizando os hidrogênios de duas moléculas de GSH para conversão de peróxido

de hidrogênio em água, produzindo uma molécula de *glutathione* oxidada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). O aumento da atividade dessa enzima, em sêmen de carneiros, tem sido associado a uma atividade antioxidante no fluido seminal, mantendo a viabilidade do espermatozoide (CASAO et al., 2010).

A *lactoferrin* é um quelante metálico presente no plasma seminal, possui a propriedade de se ligar ao ferro iônico que é um dos componentes do fluido epididimal de ovinos (DACHEUX et al., 2006) e bovinos (MOURA et al., 2010), onde desempenha a função de agente antimicrobiano, regulação da expressão gênica e proteção contra os danos da peroxidação lipídica (HE; FURMANSKI, 1995; DACHEUX et al., 2005). A *lactoferrin* tem a propriedade de ligar-se aos espermatozoides durante o trânsito epididimário (JIN et al., 1997) e/ou durante a ejaculação (THALER et al., 1990) e é provável que estes efeitos estejam relacionados à sua capacidade de sequestrar ferro iônico, prevenindo a formação de peróxidos lipídicos danosos à membrana espermática (WAKABAYASHI et al., 1999).

A *albumin* constitui um dos principais componentes do fluido da cauda do epidídimo de touros da raça holandesa (MOURA et al., 2010) e ovinos (DACHEUX et al., 2006; SOUZA et al., 2012) mas também está presente no fluido das glândulas sexuais acessórias (SOUZA et al., 2012), embora em menor quantidade relativa. Esta proteína interage com os peróxidos lipídicos contribuindo com efeito protetor da membrana espermática (ALVAREZ; STOREY, 1995; ARMSTRONG et al., 1998). A *albumin* age como receptor de esterol, fato que lhe confere a capacidade de atuar modulando a capacitação espermática (GO; WOLF, 1985; CROSS, 1998), reação acrossômica (SINGLETON; KILLIAN, 1983) e fertilização (GONCALVES et al., 2008). A *clusterin*, por sua vez, é uma glicoproteína presente em diversos fluidos fisiológicos como plasma seminal (SOUZA et al., 2012; MARTINS et al., 2013) e fluído da cauda do epidídimo (MOURA et al., 2010). Esta proteína integra o complexo de defesa das células espermáticas por atuar como chaperona, solubilizando proteínas parcialmente desestruturadas e reduzindo a citotoxicidade da precipitação proteica

induzida por estresses celulares (HUMPHREYS et al., 1999). A *clusterin* também possui o papel de inibir a lise pelo sistema complemento presente no epidídimo e nas secreções uterinas (IBRAHIM et al., 1999), o que garante uma maior viabilidade do espermatozoide durante o trânsito no trato reprodutor feminino (BJORGE et al., 1997).

Proteínas associadas à motilidade espermática

As diversas mudanças bioquímicas ocorridas nos espermatozoides durante o trânsito epididimário também conferem a estas células a capacidade expressar motilidade progressiva (ORGBIN-CRIST, 1967; AMANN; HAMMERSTEDT, 1993) e este processo também é influenciado por componentes proteicos do fluido epididimário. A *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (ZAG-2), já apresentada acima como uma proteína do epidídimo que atua na maturação espermática. Após a ejaculação, a ZAG-2 de origem prostática (AHLGREN et al., 1995) interage com o espermatozoide atuando na regulação das vias de sinalização, o que conduz a um aumento da motilidade. No plasma seminal de carneiros, a detecção de *spots* identificados como ZAG-2 foram associados com a motilidade espermática, fato que confirma a influência desta proteína na fisiologia do espermatozoide durante a maturação e após a ejaculação (RODRIGUES et al., 2013). Outro componente do plasma seminal capaz de modular a motilidade espermática é o que envolve enzimas do sistema *calicreína-cininas*. A ação da enzima *calicreína* junto ao substrato presente no plasma seminal, o cinogênio, produz as cininas que constituem os principais efetores no estímulo da motilidade espermática após a ejaculação (FINK et al., 1989; SCHILL; MISKA, 1992). A enzima *cininase II* constitui outro componente do sistema *kalikreína-cininas* encontrado no plasma seminal, secretada pelos testículos, epidídimos e próstata é identificada como a enzima conversora da *angiotensina I* (ACE) (HOHLBRUGGER et al., 1984; MISKA et al., 1988). Esta enzima catalisa a formação de *angiotensin II* e interage com receptores específicos na região da peça intermediária do

espermatozoide, intensificando eventos relacionados com a motilidade (VINSON et al., 1996).

Proteínas envolvidas na capacitação espermática

A capacitação é um processo complexo que ocorre após a ejaculação e durante o trânsito do espermatozoide pelo trato genital feminino e envolve alterações bioquímicas e estruturais da membrana espermática, incluindo a perda de componentes adsorvidos, alterações em sua composição lipídica e maior permeabilidade a íons (DE LAMIRANDE et al., 1997; CROSS, 1998).

O grupo de proteínas conhecidas como *Binder of Sperm Proteins (BSP)* compõe a maior parte do fluido das glândulas sexuais acessórias e do plasma seminal de diversas espécies de ruminantes (VILLEMURE et al., 2003; MOURA et al., 2007b; MANJUNATH et al., 2009). Estas proteínas são caracterizadas por conterem um C- e N-terminias variáveis com dois domínios de fibronectina tipo II (CALVETE et al., 1999; MANJUNATH et al., 2009), as quais conferem a capacidade destas proteínas de reconhecerem e se ligarem a fosfolipídios (MOREAU; MANJUNATH, 2000) e heparina (CHANDONNET et al., 1990). Após a ejaculação, as *BSPs* presentes no fluido das glândulas sexuais acessórias ligam-se aos espermatozoides interagindo com fosfolipídios contendo resíduos de colina que são abundantes na membrana plasmática (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; MANJUNATH et al., 1994), estimulando o efluxo de fosfolipídios e colesterol (THERIEN et al., 1999) causando uma maior permeabilidade da membrana (MOREAU; MANJUNATH, 2000), passos esses associados com a capacitação espermática. As *BSPs* permanecem ligadas aos espermatozoides durante o trânsito no trato reprodutivo feminino e mediam a interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto para a formação do reservatório espermático importante para a manutenção da sobrevivência espermática (GWATHMEY et al., 2006) e para a proteção contra os efeitos citotóxicos da precipitação proteica agindo como chaperonas sob condições de estresse (SANKHALA; SWAMY, 2010). A interação das *BSPs* com a

membrana do espermatozoide expõe um maior número de sítios de ligação para os glicosaminoglicanos, dentre eles a heparina presentes no fluido do trato reprodutivo da fêmea (THERIEN et al., 2005), que reagem com os espermatozoides (MILLER et al., 1990). De forma concatenada, os espermatozoides em trânsito através do oviduto interagem com outros componentes no fluido como a *high density lipoprotein* (HDL), que estimula ainda mais a remoção de colesterol, reduz a relação colesterol:fosfolipídios (THERIEN et al., 2001) e induz a desestabilização da membrana espermática. Devido à maior fluidez, ocorre maior influxo de cálcio na célula espermática, fato que desencadeia as vias de transdução de sinais (HURTADO DE LLERA et al., 2014) que regulam a expressão de receptores para glicoproteínas da zona pelúcida, tornando os espermatozoides aptos à reação acrossômica e interação com o oócito (BENOFF et al., 1993; VISCONTI et al., 1999; PETIT et al., 2013). Outros estudos ainda evidenciam que, além das *BSPs* representarem a família de proteínas mais abundantes no plasma seminal de ruminantes, elas também foram correlacionadas com os índices de fertilidade *in vivo* e *in vitro* de touros, e assim possivelmente estas proteínas constituem um biomarcador da fertilidade nesta espécie.

Proteínas envolvidas na reação acrossômica e fertilização

Para que ocorra a interação entre os gametas, os espermatozoides precisam expressar receptores que reconheçam componentes da zona pelúcida. Com aproximação do sítio de fertilização, a membrana que reveste o acrossôma é fundida com a membrana plasmática do espermatozoide, expondo o conteúdo do acrossôma, o qual contém antígenos de superfície e inúmeras enzimas que são responsáveis pela penetração através da camada externa do oócito, permitindo a fertilização (YAMAGATA et al., 1998; YANAGIMACHI, 2011).

A *phospholipase A2* (PLA2) é um dos constituintes do plasma seminal e desempenha importantes funções durante a capacitação espermática, reação acrossômica e etapas iniciais da fertilização, incluindo a fusão entre espermatozoide e oócito (PIETROBON et al., 2005;

ROLDAN; SHI, 2007). A expressão da *PLA2* no plasma seminal de touros da raça holandesa foi correlacionada com os índices de fertilidade destes animais (MOURA et al., 2006b) e tal associação empírica provavelmente pode ser explicada pela capacidade da *PLA2* desempenhar funções durante a interação do espermatozoide com o oócito (RIFFO; PARRAGA, 1997), as quais podem ocorrer via interação com a zona pelúcida e posterior estímulo a sinalizações intracelulares através de mensageiros secundários (YUAN et al., 2003).

É durante o transito epididimário, no processo de maturação espermática, que o espermatozoide adquire a capacidade de interagir com a zona pelúcida e efetivamente fertilizar o oócito (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993). Isto é possível graças à aquisição de novas proteínas pelo espermatozoide oriundas do fluido epididimal (COOPER et al., 1986) ou da modificação de proteínas já existentes no espermatozoide (BAKER et al., 2005; DACHEUX et al., 2006), o que resulta na criação de sítios de ligação para estruturas oocitárias ou expondo sítios já existentes (SULLIVAN et al., 2005). As glicosidades fazem parte deste grupo de proteína que atuam na maturação espermática e que possuem a capacidade de modificar glicoproteínas presentes na membrana do espermatozoide (SKUDLAREK et al., 1993; DACHEUX et al., 2005), atuando como sítios específicos de ligação para carboidratos. A *β -galactosidase* é uma destas proteínas presentes no fluido do epidídimo que se ligam aos espermatozoides durante a maturação (SKUDLAREK et al., 1993). Estas enzimas funcionam como lectinas e desempenham papel importante na fertilização, dado que a remoção de resíduos de β -galactose da zona pelúcida bloqueia a ligação dos espermatozoides (MORI et al., 1997), fato que em parte explica a relação existente entre a expressão desta enzima no plasma seminal e os índices de fertilidade de touros (MOURA et al., 2006b).

A *osteopontin (OPN)* é uma proteína com peso molecular entre 25 a 75 kDa, acídica e rica em ácidos aspártico e glutâmico (SORENSEN; PETERSEN, 1994), tendo sido isolada primeiramente do tecido da matriz óssea bovina (FRANZEN; HEINEGARD, 1985) e só

depois detectada na glândula mamária, oviduto, útero, placenta, ovário e testículos (LUEDTKE et al., 2002). A *OPN* possui funções de adesão celular, o que sugere sua participação na interação entre gametas (GONCALVES et al., 2007), remodelamento de membranas, modulação imunológica e alterações no citoesqueleto (DENHARDT, 2004). A estrutura bioquímica da *OPN* revela a existência de uma sequência RGD (arginina, glicina e aspartato) bastante conservada que confere a capacidade de ligação a integrinas, receptores potenciais da *OPN* nos espermatozoides (BUTLER, 1995; GONCALVES et al., 2007).

A *OPN* identificada no plasma seminal (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997) e no fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2006b) de touros da raça holandesa apresentou significativa associação com os índices de fertilidade avaliados por meio das taxas de não retorno ao cio de vacas inseminadas e em sistemas de fertilização *in vitro*. A adição do fluido das glândulas sexuais acessórias provenientes de touros com elevada fertilidade, onde a *OPN* é detectada em maior quantidade, no meio contendo espermatozoides da cauda do epidídimo de touros com reduzida fertilidade proporcionou um incremento na taxa de penetração nos oócitos (MOURA et al., 2007a). Neste contexto, a hipótese aceita para o mecanismo de ação da *OPN* na fertilização baseia-se no conceito de que, após a ejaculação, a *OPN* proveniente do fluido das glândulas sexuais acessórias interage com a membrana espermática por meio das integrinas (e/ou CD44) e este complexo *OPN-integrinas* liga-se com receptores na membrana do oócito (D'CRUZ, 1996). Tal hipótese pode ser corroborada pelo fato de que o fluido do oviduto bovino possui *OPN* (GABLER et al., 2003) e que o oócito também expressa integrinas (CAMPBELL et al., 2000; MOURA, 2005; THYS et al., 2009). Além de ser capaz de melhorar as taxas de fertilização *in vitro* quando os oócitos e espermatozoides foram tratados com *OPN*, o tratamento também influenciou positivamente o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos (GONCALVES et al., 2008; MONACO et al., 2009) e suínos (HAO et al., 2008), possivelmente por a *OPN* ser capaz de modular a

expressão de mensageiros secundários intracelulares influenciando o desenvolvimento embrionário (LIU; XIE, 2012).

As modificações que ocorrem na matriz extracelular são eventos da interação entre gametas e as enzimas envolvidas nesses processos, bem como seus respectivos inibidores, desempenham papel fundamental. As *matrix metalloproteinases* (*MMPs*) e seus inibidores, *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases* (*TIMPs*), têm sido detectadas no plasma seminal de várias espécies (HULBOY et al., 1997; SHIMOKAWA KI et al., 2002; MOURA et al., 2007b; SOUZA et al., 2012). O grau de ligação da *TIMP-2* nos espermatozoides de touros após a ejaculação possui relação com a capacidade fecundante do espermatozoide (MCCAULEY et al., 2001) o que sugere que esta proteína participa da interação entre gametas (CORREA et al., 2000). Touros com maior quantidade de *TIMP-2* ligadas aos espermatozoides são mais férteis quando comparados com animais com espermatozoides sem *TIMP-2* (MCCAULEY et al., 2001), sendo assim tem sido sugerido que esta proteína participa do processo de fertilização apesar de sua função ainda não esteja totalmente compreendida.

Baseado nos atributos bioquímicos, as proteínas presentes no fluido do trato reprodutivo masculino desempenham funções importantes na fisiologia espermática. Estas proteínas atuam na maturação do espermatozoide durante o trânsito epididimário, confere proteção durante o armazenamento na cauda do órgão, contribui com os processos de capacitação, sobrevivência do espermatozoide no oviduto, reação acrossômica e interação entre gametas durante a fertilização. Dessa forma, as relações existentes entre algumas destas proteínas e os índices de fertilidade em determinadas espécies indicam que as mesmas podem constituir potenciais marcadores moleculares da capacidade reprodutiva dos machos.

Criopreservação do sêmen

A criopreservação é uma biotécnica da reprodução que garante a propagação de genótipos, através da inseminação artificial, considerados de alto valor genético utilizados nos programas de melhoramento animal em diversas espécies. A utilização do sêmen criopreservado maximiza o uso de reprodutores considerados melhoradores, mesmo depois de sua morte ou incapacidade de efetuar monta. As pesquisas no campo da criopreservação de sêmen têm conquistado avanços importantes principalmente quando a meta é aumentar a viabilidade do espermatozoide após o descongelamento e manter a capacidade fertilizante por um maior tempo.

Na criopreservação, o sêmen é submetido a estresse físico e químico que resulta em danos nos espermatozoides que compromete a função celular pela ocorrência de mudanças na morfologia do acrossôma, redução da motilidade e vigor, bem como na integridade de membranas reduzindo a viabilidade espermática (RASUL et al., 2001). Os espermatozoides criopreservados ainda sofrem danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio que induzem a peroxidação lipídica e danos ao DNA espermático. Juntos, os danos da criopreservação podem reduzir a capacidade fecundante do espermatozoide em até 50% (ALVAREZ; STOREY, 1993; OZKAVUKCU et al., 2008; LEITE et al., 2011). As mudanças de temperatura e osmolaridade durante a criopreservação parecem compor os principais fatores causadores de danos aos espermatozoides. Estes fatores potencialmente atuam causando alterações morfológicas na organização e na composição dos lipídios que compõem as membranas plasmática e acrossomal bem como na função mitocondrial do espermatozoide (AMANN; PICKETT, 1987; CELEGHINI et al., 2008). Apesar do núcleo da célula espermática ser considerado uma área estável e que menos sofre a ação da criopreservação em comparação com as membranas, esse compartimento celular ainda pode ser negativamente afetado pelas variações de temperatura e osmolaridade em que a célula é submetida quando congelada e descongelada (WATSON, 1995; FORERO-GONZALEZ et al., 2012).

É durante o processo de resfriamento, que vai da temperatura fisiológica até próximo de 4°C, que os espermatozoides mais sofrem mudanças no metabolismo celular, redução na produção de energia com bloqueio da via glicolítica, da respiração celular e da frutólise, além do aumento de injúrias ao DNA e lise celular (HOLT, 2000; WATSON, 2000). As estruturas de membrana presentes nos espermatozoides são as mais importantes para a proteção contra o choque térmico e contra as injúrias causadas pelo estresse oxidativo (WATSON, 1995; DESAI et al., 2010).

A membrana plasmática é contínua e mais externa, de estrutura fina e flexível capaz de ser permeável com a manutenção de seletividade aos solutos polares, confere ao espermatozoide a condição de homeostase, o que mantém a viabilidade durante o trânsito no trato reprodutivo feminino e a capacidade fecundante da célula criopreservada (FLESCH; GADELLA, 2000; KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007). Porém, com a redução da temperatura, os lipídios componentes da membrana entram em transição de fases, passando de fluida para uma fase gelatinosa de maior rigidez. A fase transição dos lipídios é considerada crítica por que permite a formação de poros na membrana fazendo com que esta perca sua função, o que causa uma vulnerabilidade à perda e entrada de íons, descontrolando seu equilíbrio osmótico e a manutenção da fluidez da camada lipídica (PURDY; GRAHAM, 2004; LEITE et al., 2011).

A redução da temperatura gradualmente durante o período de resfriamento e equilíbrio do sêmen pode ser de forma rápida quando a temperatura é reduzida a 4,2°C/minuto ou considerada lenta quando a diminuição da temperatura ocorre a 0,1°C/minuto (JANUSKAUSKAS et al., 1999) ficando o sêmen refrigerado a aproximadamente 4°C até o contato com o vapor de nitrogênio quando é, enfim congelado. Os danos na membrana plasmática que geralmente ocorrem devido à taxa lenta de resfriamento são devidos a desidratação excessiva ou ainda pela formação de cristais de gelo entre -5°C e -10°C no meio extracelular, enquanto que no meio intracelular a água permanece resfriada, o que resulta no

aumento da concentração de solutos no fluido fora da célula difundindo mais água do meio intracelular para o extracelular ocasionando uma desidratação da célula e da própria membrana (PARKS; GRAHAM, 1992; JANUSKAUSKAS et al., 1999; LEITE et al., 2011). Na ocasião da utilização de uma curva de congelação rápida, haverá um menor tempo de exposição da célula aos solutos, conseqüentemente não haverá tempo suficiente para que ocorra a desidratação da célula estando a osmolaridade intra e extracelular semelhante. Com a redução rápida da temperatura, ocorre a formação de cristais de gelo intracelular ocasionando danos irreversíveis a membrana plasmática (WATSON, 1995; 2000). Dessa forma, a curva de congelação constitui um fator de extrema importância na manutenção da integridade celular pos-criopreservação quando os espermatozoides ficam conservados a -196°C . Outro aspecto não menos importante do que a taxa de congelação, é a descongelação do sêmen criopreservado que deve ser realizado levando em consideração qual tipo de curva de congelação foi utilizada.

O rompimento da membrana plasmática de espermatozoides que foram congelados de forma lenta é relacionado a aplicação de um descongelamento rápido, devido ao grande influxo de água para o interior da célula ora desidratada. Por outro lado, espermatozoides congelados com uma curva rápida e descongelados de forma lenta, o gelo intracelular poderá sofrer uma recristalização em cristais maiores, o que certamente provocaria a lesão mecânica da membrana (SQUIRES et al., 1999; LEITE et al., 2011).

Outro fator capaz de influenciar a organização dos componentes da membrana plasmática dos espermatozoides é o plasma seminal. Os componentes proteicos, especificamente as *Binding of Sperm Proteins* (BSPs) constituem a família de proteínas de maior abundância no plasma seminal de diversas espécies (MANJUNATH; THERIEN, 2002; MANJUNATH et al., 2009) e são considerados fatores capacitantes (THERIEN et al., 2001). As BSPs (BSP1, BSP3 e BSP5) são secretadas pelas glândulas sexuais acessórias e, como diversas outras proteínas provenientes destas glândulas, interagem com os espermatozoides

durante a ejaculação (YANAGIMACHI, 1994). Após a ejaculação, as BSPs interagem com os resíduos de colina presentes nos fosfolípidios da membrana espermática (SOUZA et al., 2008) e, juntamente com fatores de capacitação como heparina e glicosaminoglicanos, atuam estimulando o efluxo de colesterol e fosfolípidios, eventos estes envolvidos no processo de capacitação espermática (CHANDONNET et al., 1990; DESNOYERS; MANJUNATH, 1992). O fato das BSPs interagirem com os componentes da membrana espermática durante a coleta e o processamento do sêmen torna os gametas mais suscetíveis às injúrias de membrana durante a criopreservação. Em estudo recente, a *BSP1 (PDC-109)* foi depletada do sêmen de touros destinado à criopreservação através do tratamento dos tubos de coleta com anticorpos e, como consequência, houve uma melhoria na motilidade e viabilidade espermática, bem como integridade de membrana após o descongelamento do sêmen coletado nos tubos tratados com anti-*BSP1* (SRIVASTAVA et al., 2012). Estes achados congruem para a indicação do uso de metodologias capazes de “sequestrar” fatores deletérios presentes no plasma seminal ou ainda a utilização de crioprotetores contendo lipoproteínas de baixa densidade como a gema de ovo, que interagem de forma estável com as *BSPs*, impedindo sua ação prejudicial sobre a membrana plasmática (LEITE et al., 2011). O fato é que as *BSPs*, após a ejaculação, atuam desestabilizando a membrana plasmática do espermatozoide através da remoção de colesterol e fosfolípidios (THERIEN et al., 1998; 1999). No entanto, o efeito deletério das *BSPs* nos espermatozoides pode ser minimizada através da capacidade destas proteínas em interagir com as lipoproteínas de baixa densidade presentes na gema do ovo que um dos principais componentes dos diluentes utilizados na criopreservação (MANJUNATH et al., 2002). A capacidade deste componente de baixa densidade da gema do ovo de proteger os espermatozoides durante o processo de criopreservação é bastante estudada (MACDONALD; FOULKES, 1981; VISHWANATH et al., 1992), sendo que a característica da interação entre as *BSPs* e estas lipoproteínas de baixa densidade presente na maioria dos diluidores é descrita como sendo uma ligação rápida, específica e saturável (MANJUNATH et

al., 2002). O mecanismo de proteção destas lipoproteínas conferido aos espermatozoides está no fato de que elas se associam com a membrana espermática e funcionam como um “escudo” contra a remoção de colesterol realizado pelas *BSPs*, e conseqüentemente diminuindo a desestabilização da membrana (MANJUNATH et al., 2002). Outro aspecto importante é que o benefício da diluição do sêmen com diluidores contendo gema de ovo ou leite não se limita a interação direta das lipoproteínas de baixa densidade ou da *alpha-lactalbumin* presente no leite com a membrana plasmática dos espermatozoides, mas também por envolver interações entre as *BSPs* e estas lipoproteínas que funcionam, também, como sequestrantes de *BSPs* livres no meio (MANJUNATH et al., 2002; LUSIGNAN et al., 2011). O mecanismo de proteção das lipoproteínas de baixa densidade presentes na gema de ovo conferido aos espermatozoides proposto por (MANJUNATH et al., 2002) está ilustrado abaixo.

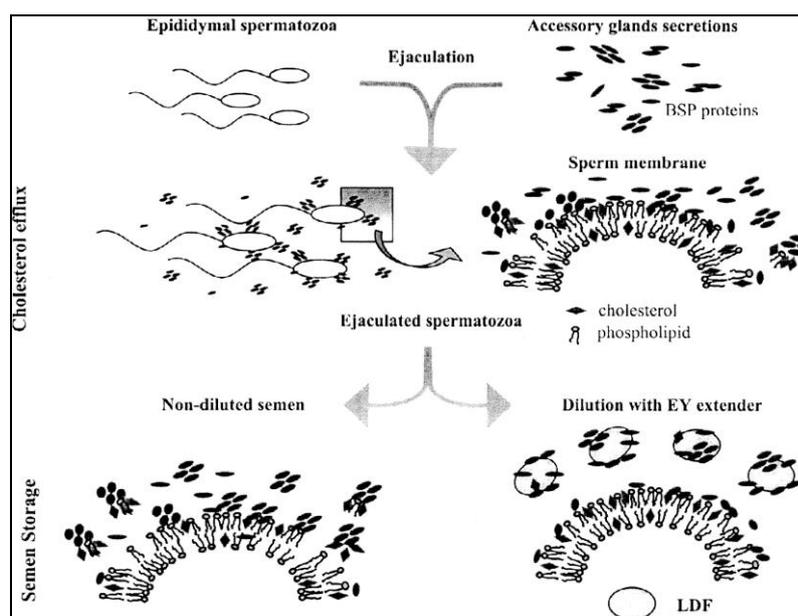


Figura 1: O mecanismo de proteção dos espermatozoides conferido pela lipoproteína de baixa densidade da gema do ovo proposto por (MANJUNATH et al., 2002).

Diante dos estudos apresentados, é sugerido que a redução e/ou eliminação das *BSPs* livres no meio seminal ou sua diluição através do meio diluidor podem representar os principais mecanismos de proteção de espermatozoides durante o processo de criopreservação. Dessa forma, o estudo sobre a interação das proteínas do plasma seminal, em

especial as *BSPs*, com os meios crioprotetores abre novas vertentes de estudos para a descoberta de novos aditivos para diluidores ou ainda metodologias que melhore os resultados qualitativo do sêmen pós-criopreservação.

Meios e aditivos utilizados para a criopreservação de espermatozoides bovinos

O conceito que define um bom diluidor é como sendo o meio capaz de conferir aos espermatozoides proteção, fonte de nutrientes e um ambiente livre de contaminantes tornando-os viáveis a fertilização após o descongelamento. Os diluidores são constituídos por componentes que garantam a preservação da membrana plasmática através da estabilização do pH, que atuem inibindo a ação de toxinas provindas do próprio metabolismo espermático, protejam os espermatozoides contra o choque térmico, controlem e mantenham o equilíbrio eletrolítico e osmótico, além de possuir fonte de energia para célula (CHAVEIRO et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em parte pelo próprio metabolismo espermático, embora as ROS possuam seu papel na regulação da função celular (DE LAMIRANDE et al., 1997), quando há um desequilíbrio e são produzidas em excesso podem causar danos irreversíveis aos espermatozoides. O fluido do trato reprodutivo masculino possui um verdadeiro “arsenal” enzimático capaz de reduzir os efeitos deletérios das ROS. Os complexos enzimáticos presentes no plasma seminal são capazes de prevenir a peroxidação lipídica e fornecem proteção ao espermatozoide desde o seu armazenamento na cauda do epidídimo até a ejaculação e durante o trânsito no trato reprodutivo feminino (AITKEN et al., 1993; AITKEN, 1995; AITKEN et al., 2003). Os sistemas enzimáticos com atividade antioxidante no plasma seminal incluem a superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase, glutatona redutase que agem como agentes redutores e protegem os espermatozoides contra a formação de peróxidos que são danosos à membrana celular (AITKEN, 1995; RÊGO et al., 2010).

O processo de criopreservação causa a geração de ROS pelos espermatozoides, podendo culminar em peroxidação lipídica das membranas (MEDEIROS et al., 2002). Os efeitos da peroxidação dos lipídios da membrana espermática ainda incluem uma redução na atividade mitocondrial com a depleção de adenosina-trifosfato (ATP) ocasionando perdas irreversíveis na motilidade, danos ao DNA e redução da capacidade de fusão com o oócito (STRADAIOLI et al., 2007). A utilização de antioxidantes associados a uma disponibilização de colesterol nos meios diluidores visa melhorar os parâmetros seminais pós-criopreservação através da redução dos efeitos deletérios dos ROS associados a uma melhor estabilidade da membrana espermática. Alguns agentes antioxidantes não enzimáticos são comumente utilizados como aditivos nos meios diluidores. A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel encontrado tanto no plasma seminal quanto na membrana celular de várias espécies de mamíferos (SIKKA, 2004), atua como inibidor primário do ROS sendo capaz de proporcionar uma maior integridade estrutural de membrana plasmática e mitocôndrias, além de melhorar as características cinéticas dos espermatozoides após a criopreservação (SILVA et al., 2013). A associação entre a trealose, um dissacarídeo não redutor com ação protetora contra a formação de cristais de gelo intracelular (STOREY et al., 1998), e a taurina, um aminoácido sulfurado que atua como antioxidante capaz de atravessar a membrana plasmática e inibir a peroxidação lipídica (FOOTE et al., 2002), tem sido sugerido como potentes aditivos para diluidores utilizados na criopreservação de sêmen, com resultados satisfatórios nos parâmetros de motilidade, viabilidade e integridade de membrana dos espermatozoides de búfalos após o descongelamento (SHIVA SHANKAR REDDY et al., 2010). Outro grupo de agentes antioxidantes comumente utilizados como aditivos em diluidores pertencem ao grupo dos tióis como a cisteamina e a glutatona. A cisteamina atua estimulando a síntese de glutatona que, além de interagir diretamente com o ROS, constitui cofator para a *glutathione peroxidase* que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos protegendo as células contra o estresse oxidativo (MEISTER, 1994; BILODEAU et al., 2001; BUCAK et al., 2007). O ácido

hialurônico ou hialuronan é o componente “chave” da matriz extracelular e participa de diversos processos biológicos influenciando, dentre outros, a manutenção da função espermática como motilidade e capacitação, a manutenção da viabilidade e a estabilização da membrana plasmática (GHOSH; DATTA, 2003; PENA et al., 2004; BUCAK et al., 2007). A ação de ambos, ácido hialurônico e a cisteamina foram capazes de conferir maior proteção ao DNA espermático através da redução dos níveis de ROS durante a criopreservação. Ainda relacionado à ação da cisteamina, a atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase foram mantidas no sêmen durante o processo de congelação e descongelação o que proporcionou maior viabilidade celular (SARIOZKAN et al., 2014).

Considerações finais

As proteínas do plasma seminal, baseado em seus atributos bioquímicos, mostram-se capazes de modular a fisiologia espermática durante o transporte espermático, desde o início da maturação no epidídimo até o momento da fertilização no trato reprodutivo feminino. As relações entre a expressão de algumas proteínas no plasma seminal associadas com precocidade sexual e a processos reprodutivos, embora que empíricas, constituem importante campo de pesquisa sobre marcadores moleculares da fertilidade no macho. Não obstante, o estudo sobre a composição proteica das células espermáticas oferece vasto campo de pesquisa, fornecendo novas percepções sobre como as proteínas do plasma seminal interagem com os espermatozoides modificando a sua fisiologia.

Em outro aspecto, os estudos comprovam que o desenvolvimento de novos diluidores destinados à criopreservação do sêmen deve considerar a forma como as proteínas seminais interagem com as moléculas crioprotetoras influenciando a capacidade os parâmetros seminais pós-descongelação. Além disso, o desenvolvimento de novos testes precisos capazes de prever precocemente o potencial reprodutivo do macho é uma constante demanda do setor ligado às biotecnologias da reprodução animal. Nesse contexto, a associação entre as

avaliações seminais convencionais e as análises bioquímicas do sêmen através de ferramentas ligadas a área da proteômica poderão contribuir de forma significativa na identificação de animais superiores e darão novos rumos ao emprego das biotecnologias da reprodução aplicada ao macho.

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, I. et al. Alteration of the isoform composition of plasma-membrane-associated rat sperm alpha-L-fucosidase during late epididymal maturation: comparative characterization of the acidic and neutral isoforms. **Biochemical Journal**, v. 333, p. 201-207.
- ABBASIHORMOZI, S. et al. Relationship of leptin administration with production of reactive oxygen species, sperm DNA fragmentation, sperm parameters and hormone profile in the adult rat. **Archives of gynecology and obstetrics**, Dec 27 2012. ISSN 1432-0711
- ACHILLI, A. et al. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. **Current biology : CB**, v. 18, n. 4, p. R157-8, Feb 26 2008.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 654-660, Nov-Dec 2005. ISSN 0196-3635.
- AHLGREN, G.; RANNEVIK, G.; LILJA, H. Impaired secretory function of the prostate in men with oligoasthenozoospermia. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 491-8.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, fertility, and development**, v. 7, n. 4, p. 659-68, 1995.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; SAWYER, D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. **Reproductive biomedicine online**, v. 7, n. 1, p. 65-70, 2003..
- AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n. 1, p. 257-65, May 1993.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 3, p. 199-209, 1993.
- ALVAREZ, J. G. STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty-acids into and peroxidative loss of fatty-acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 3, p. 334-346, 1995.
- ALVES TEIXEIRA, D. I. et al. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 79-87, 2006.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In-vitro evaluation of sperm quality - an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AN, C.-N. et al. Down-regulation of DJ-1 protein in the ejaculated spermatozoa from Chinese asthenozoospermia patients. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 19-23.e2, 2011.

- ANDERSON, G. M.; NAKADA, M. T.; DEWITTE, M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 314-320, 2004.
- ANDERSSON, E. et al. Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 10, p. 2529-34, 2002.
- ANGST, B. D.; MARCOZZI, C.; MAGEE, A. I. The cadherin superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. Pt 4, p. 625-6, 2001.
- ARMSTRONG, J. S. et al. Antioxidant potential of human serum albumin: Role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 4, p. 412-419, 1998.
- ARNESANO, F. et al. The evolutionarily conserved trimeric structure of CutA1 proteins suggests a role in signal transduction. **J Biol Chem**, v. 278, n. 46, p. 45999-6006, 2003.
- ARRUDA-ALENCAR, J. M., VIANA NETO, A. M. V., SOUZA, C. E. A., MARTINS, J. A. M., MORENO, F. B., MOREIRA, A. C. O., GUERREIRO, M.E.F, MOURA, A. A. N. A. Major proteins of the seminal plasma of new zeland white rabbits and association with semen criteria. **In: 10th World Rabbit Congress**, 2012, Sharm el Sheik - Egitoo 2012.
- ASSUMPCAO, T. I. et al. Proteome analysis of Nelore bull (*Bos taurus indicus*) seminal plasma. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 8, p. 813-7, 2005.
- AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHREE, R. L. Comparison of quality of bull semen collected in artificial vagina and by electroejaculation. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 12, p. 2292, 1961.
- AWAD, M. M. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 123, n. 3-4, p. 157-62, 2011.
- BAKER, M. A. et al. The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. **Proteomics**, v. 8, n. 11, p. 2312-21, 2008.
- BAKER, M. A. et al. The mouse sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. **Proteomics**, v. 8, n. 8, p. 1720-30, 2008.
- BAKER, M. A. et al. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1003-12, 2005.
- BALS, R.; WILSON, J. M. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 4, p. 711-20, 2003.
- BARRETT, A. J. Cystatin, the egg-white inhibitor of cysteine proteinases. **Methods in Enzymology**, v. 80, p. 771-778, 1981.
- BARTH, A. D. et al. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. **Anim Reprod Sci**, v. 84, n. 3-4, p. 315-325, 2004.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. **Iwoa State University Press, Ames.**, v. 1 ed., 1989.
- BATELLI, F. Une Methode pour obtenir Emission Complète du Liquide des Vesicules Seminales chez le Cobaye. **Physique et d' Hist. nat. de Geneve, Comp. Rend**, p. 39:73, 1922.
- BEIER, H. M.; BOHN, H.; MULLER, W. Uteroglobin-like antigen in male genital-tract secretions. **Cell and Tissue Research**, v. 165, n. 1, p. 1-11, 1975.
- BELL, M. et al. Time course of hydrogen peroxide induced changes in the lipid peroxidation of human sperm membranes. **Advances in contraceptive delivery systems : CDS**, v. 8, n. 1-2, p. 144-50, 1992.
- BELLEANNÉE, C. et al. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 59-78, 2011.

- BELLIN, M. E. et al. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 173-82, 1996.
- BELLIN, M. E. et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 8, p. 2032-9, 1998.
- BENOFF, S. et al. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 8, n. 12, p. 2141-54, 1993.
- BENZAQUEN, L. R.; NICHOLSON-WELLER, A.; HALPERIN, J. A. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. **J Exp Med**, v. 179, n. 3, p. 985-92, 1994.
- BERGERON, A. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 4, p. 461-70, 2005.
- BERNARDINI, A. et al. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 436-447, 2011.
- BHARSHANKAR, R. N.; BHARSHANKAR, J. R. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 456-60, 2000.
- BHATIA, V. N. et al. Software Tool for Researching Annotations of Proteins: Open-Source Protein Annotation Software with Data Visualization. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 23, p. 9819-9823, 2009.
- BILODEAU, J. F. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 275-86, 15 2001.
- BILODEAU, J. F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282-8, 2000.
- BJORGE, L. et al. Complement-regulatory proteins in ovarian malignancies. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 70, n. 1, p. 14-25, 6 1997.
- BOISVERT, M. et al. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 3, p. 656-661, 2004.
- BORTOLUSSI, G. et al. The northern Australian beef industry, a snapshot. 2. Breeding herd performance and management. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, n. 9, p. 1075-1091, 2005.
- BOUSSOUAR, F.; BENAHMED, M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 345-350, 2004.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976.
- BRADLEY, D. T.; ZIPFEL, P. F.; HUGHES, A. E. Complement in age-related macular degeneration: a focus on function. **Eye (London, England)**, v. 25, n. 6, p. 683-93, Jun 2011.
- BRANDTZAEG, P.; PRYDZ, H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. **Nature**, v. 311, n. 5981, p. 71-3, Sep 6-11 1984.
- BRAZDOVA, A. et al. Immunodominant Semen Proteins II: Contribution of Seminal Proteins to Female Immune Infertility. **Folia biologica**, v. 59, n. 5, p. 198-203, 2013.
- BREIMAN, L. et al. Classification and Regression Trees. **Belmont, California, USA, Wadsworth, Inc.**, 1984.
- BREITBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 129, n. 3, p. 263-8, Mar 2005.
- BREWIS, I. A.; GADELLA, B. M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 68-79, Feb 2010.

- BUCAK, M. N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060-7, Mar 15 2007.
- BUCHMAN-SHAKED, O. et al. Presence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 5, p. 702-8, Sep-Oct 2002.
- BURNS, B. M. et al. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 1. Experimental design and animal measures. **Animal Production Science**, v. 53, n. 2, p. 87-100, 2013 2013.
- BUTLER, W. T. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DOMAINS OF OSTEOPONTIN. In: DENHARDT, D. T.; BUTLER, W. T., *et al* (Ed.). **Osteopontin: Role in Cell Signalling and Adhesion**, v.760, 1995. p.6-11. (Annals of the New York Academy of Sciences).
- BUTTYAN, R. et al. Induction of the trpm-2 gene in cells undergoing programmed death. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 8, p. 3473-3481, Aug 1989.
- BYRNE, K. et al. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **Proteomics**, v. 12, n. 23-24, p. 3559-79, Dec 2012.
- CALVETE, J. J. et al. Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. **Febs Letters**, v. 444, n. 2-3, p. 260-4, Feb 12 1999.
- CALVETE, J. J. et al. Elation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **Febs Letters**, v. 407, n. 2, p. 201-206, Apr 28 1997.
- CAMPBELL, K. D.; REED, W. A.; WHITE, K. L. Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1702-9, Jun 2000.
- CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, Dec 1997.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, May 2004.
- CASAO, A. et al. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 8, p. 59, 2010.
- CASTILLO, J.; AMARAL, A.; OLIVA, R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. **Andrology**, Dec 10 2013.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2a. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49.
- CELEGHINI, E. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim Reprod Sci**, v. 104, n. 2-4, p. 119-31, Mar 3 2008.
- CHABORY, E. et al. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 4, p. 1321-31, Apr 2010.
- CHANDONNET, L. et al. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, n. 4, p. 313-318, Aug 1990.
- CHARD, T. et al. The concentrations of transferrin, beta-2-microglobulin, and albumin in seminal plasma in relation to sperm count. **Fertility and Sterility**, v. 55, n. 1, p. 211-213, Jan 1991.
- CHAVEIRO, A. et al. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1875-90, Jun 2006.

- CHEN, M. S. et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 21, p. 11830-5, Oct 12 1999.
- CHOI, N. H.; MAZDA, T.; TOMITA, M. A serum-protein sp40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes. **Molecular Immunology**, v. 26, n. 9, p. 835-840, Sep 1989.
- CHRISTMAS, P. et al. Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. **J Biol Chem**, v. 266, n. 4, p. 2499-507, Feb 5 1991.
- COOPER, T. G.; WAITES, G. M.; NIESCHLAG, E. The epididymis and male fertility. A symposium report. **International journal of andrology**, v. 9, n. 2, p. 81-90, Apr 1986.
- CORBET, N. J. et al. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. **Animal Production Science**, v. 53, n. 2, p. 101-113, 2013 2013.
- CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 213-27, Mar-Apr 2009.
- CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 721-31, Oct 1 1997.
- CORREA, L. M. et al. A role for a TIMP-3-sensitive, Zn²⁺-dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion. **Developmental Biology**, v. 225, n. 1, p. 124-134, Sep 1 2000.
- COULTHARD, M. G. et al. Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. **The American journal of pathology**, v. 181, n. 5, p. 1493-503, Nov 2012.
- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 1, p. 7-11, Jul 1998.
- CRUZ, F. B. et al. Internal artificial vagina (VAI) to assess breeding behavior of young Bos taurus and Bos indicus bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 126, n. 3-4, p. 157-61, Jul 2011.
- CUNNINGHAM, K. A. et al. Poly-immunoglobulin receptor-mediated transport of IgA into the male genital tract is important for clearance of Chlamydia muridarum infection. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 60, n. 5, p. 405-14, Nov 2008.
- D'AMOURS, O. et al. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 3, p. 545-56, Mar 2010.
- D'CRUZ, O. J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 1, p. d161-76, 1996.
- D'ERRICO, G. et al. Enforcing the positive charge of N-termini enhances membrane interaction and antitumor activity of bovine seminal ribonuclease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1808, n. 12, p. 3007-15, Dec 2011.
- DA SILVA, B. F. et al. Differential seminal plasma proteome according to semen retrieval in men with spinal cord injury. **Fertility and Sterility**, Jul 10 2013.
- DACHEUX, J. L. et al. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 36-42, May 16 2006.
- DACHEUX, J. L. et al. Mammalian epididymal proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1-2, p. 45-50, Jul 10 2009.
- DACHEUX, J. L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 319-41, Jan 15 2005.
- DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, May 1 2003.
- DANSHINA, P. V. et al. Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 1, p. 136-145, Jan 2010.

- DAVALIEVA, K. et al. Proteomic analysis of seminal plasma in men with different spermatogenic impairment. **Andrologia**, v. 44, n. 4, p. 256-64, Aug 2012.
- DAVRINCHE, C.; ABBAL, M.; CLERC, A. Molecular characterization of human complement factor B subtypes. **Immunogenetics**, v. 32, n. 5, p. 309-12, 1990.
- DE LAMIRANDE, E. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of reproduction**, v. 2, n. 1, p. 48-54, Jan 1997.
- DE MATEO, S. et al. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. **Proteomics**, v. 11, n. 13, p. 2714-26, Jul 2011.
- DE PAUL, A. L. et al. Soluble p-cadherin found in human semen. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 44-7, Jan-Feb 2005.
- DENHARDT, D. T. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, May 10-12, 2002. **Calcified Tissue International**, v. 74, n. 3, p. 213-219, March 2004.
- DESAI, N. R. et al. Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 4, p. 1541-3, Sep 2010.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, May 15 1992.
- DIAZ-PEREZ, E.; MEIZEL, S. Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 2, p. 122-30, Feb 1992.
- DING, Z. et al. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 9, p. 1124-1131, Sep 2007.
- DOSTALOVA, Z. et al. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, n. 7, p. 457-61, Jul 1994.
- DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 70-79, May 16 2006.
- DRUART, X. et al. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of proteomics**, v. 91C, p. 13-22, Jun 6 2013.
- DUBE, E. et al. Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 6, p. 1034-44, Jun 2007.
- DYER, K. D.; ROSENBERG, H. F. The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense. **Molecular diversity**, v. 10, n. 4, p. 585-97, Nov 2006.
- DZIUK, P. J.; GRAHAM, E. F.; PETERSEN, W. E. The technique of electroejaculation and its use in dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 37, n. 9, p. 1035-1041, 1954 1954.
- EDDY, E. M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D. A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 103-15, May 1 2003.
- ELKINA, Y. L. et al. Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Structural basis for enhanced stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 12, p. 2207-2212, 2010.
- ELSBACH, P.; WEISS, J. **Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes**. 1992. 603-636 ISBN 0-88167-880-5.
- EVANS, J. P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. **Human reproduction update**, v. 8, n. 4, p. 297-311, Jul-Aug 2002.

- FARRELL, P. et al. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 1, p. 208-10, Jul 1995.
- FELIPE-SILVA, A. S. et al. Effects of the extender in the semen post – thaw viability in young dairy Gyr bulls (*Bos taurus indicus*), pre – selected by breeding soundness evaluation. **Braslian Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 63, n. 1, p. 81-86, 2011.
- FELLOUS, M.; COLLE, A.; TONNELLE, C. Expression of human beta2-microglobulin on human spermatozoa. **European Journal of Immunology**, v. 6, n. 1, p. 21-24, 1976 1976.
- FINK, E. et al. Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma Angiotensin converting enzyme in human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 247B, n. 1, p. 311-5, Feb 1989.
- FITZPATRICK, L. A. et al. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 39-49, May 15 2002.
- FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, Nov 10 2000.
- FONG, S. T.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T. O. Molecular-genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1127-1137, Mar 1995.
- FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 13-23, May 15 2002.
- FORDYCE, G. et al. Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1140-1148, Sep 15 2006.
- FORERO-GONZALEZ, R. A. et al. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44 Suppl 1, p. 154-9, May 2012.
- FOUCHECOURT, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. Glutathione-independent prostaglandin D-2 synthase in ram and stallion epididymal fluids: Origin and regulation. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 3, p. 558-566, Mar 1999.
- FOUCHECOURT, S. et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1790-803, Jun 2000.
- FOUQUET, J. P.; KANN, M. L. Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa - fact or artifact. **Microscopy Research and Technique**, v. 20, n. 3, p. 251-258, Feb 1 1992.
- FOURNIER, T.; MEDJOUBI, N. N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1482, n. 1-2, p. 157-71, Oct 18 2000.
- FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of 2 sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, n. 3, p. 715-724, 1985 1985.
- FU, Y. et al. Expression of Eph A molecules during swine embryo implantation. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 3, p. 2179-85, Mar 2012.
- FUJIWARA, H. et al. Human endometrial epithelial cells express ephrin A1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 87, n. 12, p. 5801-7, Dec 2002.
- FUNDELE, R.; KRIETSCH, W. K. Purification and properties of the phosphoglycerate mutase isozymes from the mouse. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 965-8, 1985.
- FUNDELE, R. et al. Developmental activation of phosphoglycerate mutase-2 in the testis of the mouse. **Developmental Biology**, v. 124, n. 2, p. 562-6, Dec 1987.

FURMAN, J. W.; BALL, L.; SEIDEL, G. E., JR. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 665-70, Apr 1975.

GABLER, C.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 126, n. 6, p. 721-9, Dec 2003.

GATTI, J. L. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 321-39, Jul 2004.

GAVIRAGHI, A. et al. Proteomics to investigate fertility in bulls. **Veterinary research communications**, v. 34 Suppl 1, p. S33-6, Jun 2010.

GERENA, R. L. et al. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 3, p. 826-833, Mar 1998.

GHOSH, I.; DATTA, K. Sperm surface hyaluronan binding protein (HABP1) interacts with zona pellucida of water buffalo (*Bubalus bubalis*) through its clustered mannose residues. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 2, p. 235-44, Feb 2003.

GILMONT, R. R. et al. Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. **Biology of reproduction**, v. 43, n. 1, p. 151-7, Jul 1990.

GO, K. J.; WOLF, D. P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. **Biology of reproduction**, v. 32, n. 1, p. 145-153, 1985 1985.

GOLDBERG, E. Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. **Science (New York, N.Y.)**, v. 139, n. 3555, p. 602-3, Feb 15 1963.

GONCALVES, R. F.; STAROS, A. L.; KILLIAN, G. J. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43, n. 6, p. 720-9, Dec 2008.

GONCALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alphaV and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 468-74, Feb 2007.

GROVES, J. T.; KURIYAN, J. Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 6, p. 659-65, Jun 2010.

GWATHMEY, T. M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-7, Oct 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1-8, Jul 1990.

HAO, Y. et al. Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 2, p. 291-8, Feb 2008.

HASSAN, M. I. et al. Zinc alpha 2-glycoprotein: A multidisciplinary protein. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 892-906, Jun 2008.

HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R. Generalized Additive Models. **Chapman & Hall/CRC** 1990.

HE, J.; FURMANSKI, P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. **Nature**, v. 373, n. 6516, p. 721-4, Feb 23 1995.

HILL, H. J. et al. Electroejaculation in the bull. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 128, n. 8, p. 375-80, Apr 15 1956.

HINTON, B. T. et al. The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. **Current topics in developmental biology**, v. 33, p. 61-102, 1996.

HOHLBRUGGER, G.; PSCHORR, J.; DAHLHEIM, H. Angiotensin I converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 41, n. 2, p. 324-5, Feb 1984.

HOLMES, S. D.; LIPSHULTZ, L. I.; SMITH, R. G. Transferrin and gonadal dysfunction in man. **Fertility and Sterility**, v. 38, n. 5, p. 600-604, 1982 1982.

HOLROYD, R. G. et al. Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 67-79, May 15 2002.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim Reprod Sci**, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, Aug 18 2000.

HOOPER, L. V. et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. **Nature immunology**, v. 4, n. 3, p. 269-73, Mar 2003.

HOUGH, S. R.; PARKS, J. E. Platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 4, p. 912-916, Apr 1994.

HULBOY, D. L.; RUDOLPH, L. A.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 27-45, Jan 1997.

HUMPHREYS, D. T. et al. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 6875-6881, Mar 12 1999.

HURTADO DE LLERA, A. et al. The Calcium/CaMKKalpha/beta and the cAMP/PKA Pathways Are Essential Upstream Regulators of AMPK Activity in Boar Spermatozoa. **Biology of reproduction**, Jan 3 2014.

IBRAHIM, N. M.; FOSTER, D. N.; CRABO, B. G. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 891-902, Sep-Oct 2001.

IBRAHIM, N. M. et al. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 887-94, Nov-Dec 2000.

IBRAHIM, N. M. et al. Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 863-77, Sep-Oct 2001.

IBRAHIM, N. M. et al. Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. **Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 230-240, March-April 1999.

IGDOURA, S. A.; MORALES, C. R.; HERMO, L. Differential expression of cathepsin-B and cathepsin-D in testis and epididymis of adult rats. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 545-557, May 1995.

IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 906-13, Dec 2007.

IJIRI, T. W. et al. Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation. **Proteomics**, v. 11, n. 20, p. 4047-4062, 2011.

INAYAT, S. et al. High levels of cathepsins B, L and S in human seminal plasma and their association with prostasomes. **Andrologia**, v. 44, n. 6, p. 423-7, Dec 2012.

ISHIKAWA, E.; OLIVER, R. M.; REED, L. J. Alpha-Keto acid dehydrogenase complexes, V. Macromolecular organization of pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes isolated from beef kidney mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, n. 2, p. 534-41, Aug 1966.

ISHITSUKA, R. et al. Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, and VI. **J Biol Chem**, v. 273, n. 16, p. 9935-41, Apr 17 1998.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. **IUBMB life**, v. 58, n. 7, p. 389-94, Jul 2006.

JANUSKAUSKAS, A. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 641-58, Sep 1999.

JARVI, K. et al. Platelet-activating-factor acetylhydrolase in the male reproductive-tract - origin and properties. **International journal of andrology**, v. 16, n. 2, p. 121-127, Apr 1993.

JHA, K. N. et al. Biochemical and structural characterization of apolipoprotein A-I binding protein, a novel phosphoprotein with a potential role in sperm capacitation. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2108-2120, May 2008.

JIMENEZ-RABADAN, P. et al. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtiberica buck ejaculates. **Anim Reprod Sci**, v. 132, n. 1-2, p. 88-95, May 2012. ISSN 1873-2232 (Electronic) 0378-4320 (Linking).

JIN, Y. Z. et al. Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, n. 4, p. 490-6, Aug 1997.

JOBIM, M. I. 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. 255-66, Jan 15 2004.

JOBIM, M. I. M. et al. Albumin and osteopontin - seminal plasma proteins associated with bovine semen freezability. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v. 26, p. 296-305, 2002.

JOBIM, M. I. M. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 765-771, Sep 1 2011.

JOHNSTON, D. J. et al. Genetics of heifer puberty in two tropical beef genotypes in northern Australia and associations with heifer- and steer-production traits. **Animal Production Science**, v. 49, n. 5-6, p. 399-412, 2009. ISSN 1836-5787. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000266013800005 >.

JONES, R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 73-84, 1998 1998. ISSN 0022-4251.

KAETZEL, C. S. **The Polymeric Immunoglobulin Receptor**. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2013.

KAJI, K.; KUDO, A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 127, n. 4, p. 423-9, Apr 2004.

KAMARUDDIN, M. et al. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 36, n. 5, p. 327-34, Oct 2004.

KAPPLER, U.; NOUWENS, A. S. The molybdoproteome of *Starkeya novella*--insights into the diversity and functions of molybdenum containing proteins in response to changing growth conditions. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 4, p. 325-34, Apr 2013a.

_____. The molybdoproteome of *Starkeya novella* - insights into the diversity and functions of molybdenum containing proteins in response to changing growth conditions. **Metallomics : integrated biometal science**, Jan 11 2013b.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43 Suppl 2, p. 368-73, Jul 2008.

KAUNISTO, K. et al. Expression of carbonic anhydrase isoenzymes IV and II in rat epididymal duct. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 6, p. 1350-7, Jun 1995.

KELLY, V. C. et al. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5826-33, Nov 2006.

KERKHOFF, C.; KLEMP, M.; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1448, n. 2, p. 200-11, Dec 10 1998.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 77, n. 2, p. 117-21, Aug 2007.

KIKUCHI, M. et al. Relationship between seminal plasma lactoferrin and gonadal function in horses. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 11, p. 1273-4, Nov 2003.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, Dec 1993.

KIMURA, K.; ASAMI, K.; YAMAMOTO, M. Effect of heat shock treatment on the production of variant testosterone-repressed prostate message-2 (TRPM-2) mRNA in culture cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 15, n. 4, p. 251-257, Dec 1997.

KIRCHHOFF, C. et al. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. **Andrologia**, v. 30, n. 4-5, p. 225-232, Aug-Sep 1998.

KIRCHHOFF, C.; OSTERHOFF, C.; YOUNG, L. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 4, p. 847-856, Apr 1996.

KLINFELTER, G. R. Saga of a sperm fertility biomarker. **Anim Reprod Sci**, v. 105, n. 1-2, p. 90-103, Apr 2008.

KOGA, K. et al. Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3352-5, Sep 2000.

KOGA, K. et al. Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5609-14, Nov 2001.

KOGA, K. et al. Evidence for the presence of angiogenin in human testis. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 369-74, May-Jun 2004.

KONCZOL, K. et al. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. **Neurochemistry international**, v. 57, n. 3, p. 189-97, Oct 2010.

KOZIOROWSKA-GILUN, M. et al. Antioxidant defence system of boar cauda epididymal spermatozoa and reproductive tract fluids. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 46, n. 3, p. 527-33, Jun 2011.

KRATZ, E. et al. Alterations of branching and differential expression of sialic acid on alpha-1-acid glycoprotein in human seminal plasma. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 331, n. 1-2, p. 87-95, May 2003.

KRAUS, M. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of reproductive immunology**, v. 65, n. 1, p. 33-46, Feb 2005.

LAKI, K. The action of thrombin on fibrinogen. **Science (New York, N.Y.)**, v. 114, n. 2965, p. 435-436, 1951.

LANDI, C. et al. Towards a functional proteomics approach to the comprehension of idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, systemic sclerosis and pulmonary Langerhans cell histiocytosis. **Journal of proteomics**, v. 83, p. 60-75, May 27 2013.

LEITE, P. A. et al. Criopreservação do Sêmen Bovino. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

LEON, H. et al. Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. **Theriogenology**, v. 36, n. 3, p. 349-55, Sep 1991.

- LEV, N. et al. DJ-1 protects against dopamine toxicity. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 116, n. 2, p. 151-60, Feb 2009.
- LI, Y. C. et al. Afaf, a novel vesicle membrane protein, is related to acrosome formation in murine testis. **Febs Letters**, v. 580, n. 17, p. 4266-73, Jul 24 2006.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-677, 1988 1988.
- LIU, Q.; XIE, Q.-Z. Osteopontin and male reproduction. **Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology**, v. 18, n. 5, p. 446-9, 2012-May 2012.
- LOGDBERG, L.; WESTER, L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1482, n. 1-2, p. 284-97, Oct 18 2000.
- LUCONI, M. et al. Uteroglobulin and transglutaminase modulate human sperm functions. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 5, p. 676-88, Sep-Oct 2000.
- LUEDTKE, C. C. et al. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1437-1448, May 2002.
- LUSIGNAN, M. F. et al. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 3, p. 457-64, Sep 2011.
- MACDONALD, B. J.; FOULKES, J. A. A spectrofluorometric investigation, using 1-anilino-naphthalene-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 63, n. 2, p. 407-14, Nov 1981.
- MAHFOUZ, R. Z. et al. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 814-821, 2010.
- MALM, J. et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4297-302, Jul 2000.
- MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal-vesicles bind to spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 4, p. 977-977, Apr 1994.
- MANJUNATH, P. et al. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 3, p. 394-397, Mar 2009.
- MANJUNATH, P. et al. Apolipoprotein-a-i binds to a family of bovine seminal plasma-proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 28, p. 16853-16857, Oct 5 1989.
- MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-8, Oct 2002.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical-characterization of 3 major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemical Journal**, v. 241, n. 3, p. 685-692, Feb 1 1987.
- MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of reproductive immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 109-19, Jan 2002.
- MARCO-JIMENEZ, F.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43, n. 4, p. 403-8, Aug 2008.
- MARIN-BRIGGILER, C. I. et al. Expression of epithelial cadherin in the human male reproductive tract and gametes and evidence of its participation in fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 10, p. 561-71, Oct 2008.

- MARQUINEZ, A. C. et al. Identification of gp17 glycoprotein and characterization of prostatic acid phosphatase (PAP) and carboxypeptidase E (CPE) fragments in a human seminal plasma fraction interacting with concanavalin A. **Journal of protein chemistry**, v. 22, n. 5, p. 423-9, Jul 2003.
- MARRS, J. A.; NELSON, W. J. Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. **International review of cytology**, v. 165, p. 159-205, 1996.
- MARTIG, R. C.; ALMQUIST, J. O.; FOSTER, J. Reproductive capacity of beef bulls. V. Fertility and freezability of successive ejaculates collected by different methods. **Journal of Animal Science**, v. 30, n. 1, p. 60-2, Jan 1970.
- MARTINEZ-HEREDIA, J. et al. Proteomic identification of human sperm proteins. **Proteomics**, v. 6, n. 15, p. 4356-69, Aug 2006.
- MARTINS, J. A. M. et al. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 115-127, 2013.
- MARTINS, J. A. M. et al. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 115-127, June 2013 2013.
- MATIGIAN, N. et al. Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. **Disease models & mechanisms**, v. 3, n. 11-12, p. 785-98, Nov-Dec 2010.
- MATOUSEK, J.; KLAUDY, J. Qualitative and quantitative analyses of seminal ribonuclease in reproductive tract fluids of bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 51, n. 2, p. 111-118, Apr 30 1998.
- MCCAULEY, T. C. et al. Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, n. 2, p. 145-53, Oct 1999.
- MCCAULEY, T. C. et al. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 3, p. 336-341, Mar 2001.
- MCGOWAN, M. R. et al. Bull selection and use in northern Australia. 1. Physical traits. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 25-37, May 15 2002.
- MEDEIROS, C. M. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-44, Jan 1 2002.
- MEISTER, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. **Cancer research**, v. 54, n. 7 Suppl, p. 1969s-1975s, Apr 1 1994.
- MELIAN, E. B. et al. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. **Journal of virology**, v. 84, n. 3, p. 1641-7, Feb 2010.
- METAYER, S. et al. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1219-1229, May 2002.
- MIKI, K. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 47, p. 16501-6, Nov 23 2004.
- MILARDI, D. et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, p. 67-73.e1, 2012.
- MILLER, D.; BROUGH, S.; AL-HARBI, O. Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 7, n. 5, p. 637-45, May 1992.
- MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of reproduction**, v. 42, n. 5-6, p. 899-915, May-Jun 1990.

MISKA, W.; CROSECK, H.; SCHILL, W. B. Kininase II from human seminal plasma. Isolation and properties. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 369, n. 6, p. 493-6, Jun 1988.

MOLLAN, T. L. et al. Alpha-hemoglobin stabilizing protein (AHSP) markedly decreases the redox potential and reactivity of alpha subunits of human HbA with hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, Dec 21 2012.

MONACO, E. et al. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 450-457, Feb 2009.

MOR, I. et al. Acetylcholinesterase-R increases germ cell apoptosis but enhances sperm motility. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 2, p. 479-95, Apr 2008.

MORALES, P. et al. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 18, n. 5, p. 1010-7, May 2003.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1487, n. 1, p. 24-32, Aug 24 2000. ISSN 1388-1981.

MORI, E.; MORI, T.; TAKASAKI, S. Binding of mouse sperm to beta-galactose residues on egg zona pellucida and asialofetuin-coupled beads. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 1, p. 95-9, Sep 8 1997.

MORTARINO, M. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 797-801, May 1998.

MOSTOV, K. E.; FRIEDLANDER, M.; BLOBEL, G. The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. **Nature**, v. 308, n. 5954, p. 37-43, Mar 1-7 1984.

MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 3-10, Jan-Mar 2005.

MOURA, A. A. et al. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 139-144, 2011.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 2, p. 214-222, Feb 2007.

MOURA, A. A. et al. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 534-541, Jul-Aug 2006.

_____. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, Apr 2007.

MOURA, A. A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, Mar-Apr 2006.

MOURA, A. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, Sep 10 2010. ISSN 1874-3919.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 2, p. 540-7, Aug 2004.

MURTHY, A. R. K. et al. *In vitro* candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 11, p. 6291-6301, Dec 1 1993.

NAGAKUBO, D. et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 231, n. 2, p. 509-13, Feb 13 1997.

NAGASE, H. et al. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. **5th International Congress Animal Reproduction A.I., 1964.**, v. 4, p. 410-415, 1964.

- NAVARATNAM, D. S. et al. Hydrophobic protein that copurifies with human brain acetylcholinesterase: amino acid sequence, genomic organization, and chromosomal localization. **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 5, p. 2146-53, May 2000.
- NICHI, M. et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-8, Sep 1 2006.
- NOSKE, I. G.; GOODING, M. Evidence of a uteroglobin-like protein in epithelial cells of reproductive and non-reproductive tissues of the rabbit. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 193-6, Sep 1978.
- NOUWENS, A. S. et al. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Electrophoresis**, v. 21, n. 17, p. 3797-809, Nov 2000.
- OCHS, D.; WOLF, D. P. Actin in ejaculated human sperm cells. **Biology of reproduction**, v. 33, n. 5, p. 1223-6, Dec 1985.
- OHTA, A.; MOHRI, T.; OHYASHIKI, T. Effect of lipid peroxidation on membrane-bound Ca²⁺-ATPase activity of the intestinal brush-border membranes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 984, n. 2, p. 151-7, Sep 4 1989.
- ORGBIN-CRIST, M. C. Sperm maturation in rabbit epididymis. **Nature**, v. 216, n. 5117, p. 816-8, Nov 25 1967.
- OZKAVUKCU, S. et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 25, n. 8, p. 403-11, Aug 2008.
- PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 469-79, Aug 2005.
- PANIDIS, D. et al. Orosomucoid levels in the seminal plasma of fertile and infertile men. **Archives of andrology**, v. 30, n. 3, p. 161-4, May-Jun 1993.
- PARK, J. Y. et al. Fibrinogen-like substance and thrombin-like enzyme in seminal plasma: coagulation system of human semen. **Archives of andrology**, v. 38, n. 1, p. 29-36, Jan-Feb 1997.
- PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 168, n. 3, p. 215-29, Nov 2004.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-22, Aug 1992.
- PARVANOV, P. Study on the effect of method of bull semen collection upon several qualitative parameters of fresh and after thawing of semen. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 2, p. 233-237, 2000.
- PEDDINTI, D. et al. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC systems biology**, v. 2, p. 19, 2008.
- PEITSCH, M. C. et al. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). **The EMBO journal**, v. 12, n. 1, p. 371-7, Jan 1993.
- PELOILLE, S. et al. Interactions between ovine cathepsin L, cystatin C and alpha 2-macroglobulin. Potential role in the genital tract. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 244, n. 1, p. 140-6, Feb 15 1997a.
- _____. Interactions between ovine cathepsin L, cystatin C and alpha(2)-macroglobulin - Potential role in the genital tract. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, n. 1, p. 140-146, Feb 15 1997b.
- PENA, F. J. et al. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 63-70, Jan 1 2004.
- PERRIER, A. L. et al. Two distinct proteins are associated with tetrameric acetylcholinesterase on the cell surface. **J Biol Chem**, v. 275, n. 44, p. 34260-5, Nov 3 2000.

- PERRY, A. C. et al. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. **The Biochemical journal**, v. 285 (Pt 3), p. 863-70, Aug 1 1992.
- PETERSEN, B. H. et al. Human seminal plasma inhibition of complement. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 96, n. 4, p. 582-91, Oct 1980.
- PETERSSON, U. et al. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. **Bone**, v. 34, n. 6, p. 949-60, Jun 2004.
- PETIT, F. M. et al. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 28, n. 4, p. 852-65, Apr 2013.
- PIETROBON, E. O. et al. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, n. 1, p. 58-63, Jan 2005.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 36-45, Feb 2004.
- PUROHIT, S. et al. Impaired E-cadherin expression in human spermatozoa in a male factor infertility subset signifies E-cadherin-mediated adhesion mechanisms operative in sperm-olemma interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 3, p. 903-9, Apr 9 2004.
- QU, F. et al. The role of Zn-alpha2 glycoprotein in sperm motility is mediated by changes in cyclic AMP. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 134, n. 4, p. 569-76, Oct 2007.
- QUAYLE, A. J.; JAMES, K. Immunosuppression by seminal plasma and its possible biological significance. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 38, n. 1-2, p. 87-100, 1990 1990.
- QUIRINO, C. R. et al. Genetic parameters of libido in Brazilian Nelore bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 1-7, 2004.
- RACZEK, S. et al. Immunocytochemical localization of some lysosomal hydrolases, their presence in luminal fluid and their directional secretion by human epididymal cells in culture. **Cell and Tissue Research**, v. 280, n. 2, p. 415-425, May 1995.
- RADER, D. J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 12, p. 3090-3100, Dec 2006.
- RAIJMAKERS, M. T. et al. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 1, p. 169-72, Jan 2003.
- RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, p. 278-83, Mar-Apr 2001.
- RAWE, V. Y. et al. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 3, p. 573-80, Mar 2008.
- RED-HORSE, K. et al. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 18, p. 4097-106, Sep 2005.
- RÊGO, J. P. A. Análise proteômica do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês adultos. **Universidade Federal do Ceará. Pós-Graduação em Zootecnia (Dissertação de Mestrado)**, p. 109, 2010.
- RÊGO, J. P. A. et al. Antioxidant enzyme activity in reproductive tract fluids of tropically-adapted rams. **Illinois Symposium on Reproductive Sciences - ISRS**, v. 1, n. 53, 2010.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2631-9, Jun 1 2004.

REYES-MORENO, C. et al. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 159-66, Jan 2002.

RIFFO, M. S.; PARRAGA, M. Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. **The Journal of experimental zoology**, v. 279, n. 1, p. 81-8, Sep 1 1997.

RITONJA, A. et al. The complete amino-acid-sequence of bovine cathepsin-s and a partial sequence of bovine cathepsin-l. **Febs Letters**, v. 283, n. 2, p. 329-331, Jun 3 1991.

RODRIGUES, M. A. M. et al. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2-3, p. 94-100, Jan 2013.

ROLDAN, E. R.; SHI, Q. X. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, p. 89-104, 2007.

ROMMELAERE, H. et al. Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11975-9, Dec 15 1993.

ROTH, J. et al. MRP 8 and MRP14, s-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma-membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. **Blood**, v. 82, n. 6, p. 1875-1883, Sep 15 1993.

ROUDEBUSH, W. E.; DIEHL, J. R. Platelet-activating factor content in boar spermatozoa correlates with fertility. **Theriogenology**, v. 55, n. 8, p. 1633-1638, May 1 2001.

ROUDEBUSH, W. E.; PURNELL, E. T. Platelet-activating factor content in human spermatozoa and pregnancy outcome. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 2, p. 257-260, Aug 2000.

SANCHEZ, L. M.; LOPEZOTIN, C.; BJORKMAN, P. J. Biochemical characterization and crystalization of human Zn-alpha(2)-glycoprotein, a soluble class I major histocompatibility complex homolog. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4626-4630, Apr 29 1997.

SANKHALA, R. S.; SWAMY, M. J. The major protein of bovine seminal plasma, PDC-109, is a molecular chaperone. **Biochemistry**, v. 49, n. 18, p. 3908-3918, May 11 2010.

SANZ, L. et al. The complete primary structure of the spermadhesin awn, a zona-pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. **Febs Letters**, v. 300, n. 3, p. 213-218, Apr 6 1992.

SARIOZKAN, S. et al. Antioxidative effects of cysteamine, hyaluronan and fetuin on post-thaw semen quality, DNA integrity and oxidative stress parameters in the Brown Swiss bull. **Andrologia**, Feb 6 2014.

SCHILL, W. B.; MISKA, W. Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. **Andrologia**, v. 24, n. 2, p. 69-75, Mar-Apr 1992.

SCHWAAB, V. et al. GPx3: The plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 4, p. 362-372, Dec 1998.

SENSIBAR, J. A. et al. Localization and molecular heterogeneity of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) among ventral prostate, seminal vesicle, testis, and epididymis of rats. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 2, p. 233-42, Aug 1993.

SHAO, C. et al. Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2. **J Biol Chem**, v. 281, n. 42, p. 31689-95, Oct 20 2006.

SHIMOKAWA KI, K. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 1, p. 32-6, Jan 2002.

SHIVA SHANKAR REDDY, N.; JAGAN MOHANARAO, G.; ATREJA, S. K. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. **Anim Reprod Sci**, v. 119, n. 3-4, p. 183-90, Jun 2010.

SHIVAJI, S. et al. Localization of bovine seminal plasma rna-a bs1, on the surface of bovine spermatozoa. **Cellular and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 285-291, 1989 1989.

SHOJAEI SAADI, H. A. et al. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal of proteomics**, v. 82, p. 64-80, Apr 26 2013.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, Jan-Feb 2004.

SILKENSEN, J. R.; SCHWOCHAU, G. B.; ROSENBERG, M. E. The role of clusterin in tissue-injury. **Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 72, n. 11-12, p. 483-488, Nov-Dec 1994. ISSN 0829-8211. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994QY48900007 >.

SILKENSEN, J. R. et al. Clusterin promotes the aggregation and adhesion of renal porcine epithelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 6, p. 2646-2653, Dec 1995.

SILVA, S. V. et al. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Anim Reprod Sci**, v. 137, n. 1-2, p. 37-44, Feb 2013.

SINGLETON, C. L.; KILLIAN, G. J. A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. **Journal of Andrology**, v. 4, n. 2, p. 150-6, Mar-Apr 1983.

SIRIGU, P.; PERRA, M. T.; TURNO, F. Immunohistochemical study of secretory IgA in the human male reproductive tract. **Andrologia**, v. 27, n. 6, p. 335-9, Nov-Dec 1995.

SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Cellular carboxypeptidases. **Immunological reviews**, v. 161, p. 129-41, Feb 1998.

SKIDGEL, R. A.; JOHNSON, A. R.; ERDOS, E. G. Hydrolysis of opioid hexapeptides by carboxypeptidase N. Presence of carboxypeptidase in cell membranes. **Biochemical pharmacology**, v. 33, n. 21, p. 3471-8, Nov 1 1984.

SKUDLAREK, M. D. et al. Beta-D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 2, p. 204-13, Aug 1993.

SNEL, B. et al. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 18, p. 3442-4, Sep 15 2000.

SOLIS, D. et al. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. **Febs Letters**, v. 431, n. 2, p. 273-278, Jul 17 1998.

SONKSEN, J.; OHL, D. A. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. **International journal of andrology**, v. 25, n. 6, p. 324-32, Dec 2002.

SORENSEN, E. S.; PETERSEN, T. E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 198, n. 1, p. 200-5, Jan 14 1994.

SOTTRUPJENSEN, L. Alpha-macroglobulins - structure, shape, and mechanism of proteinase complex-formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 20, p. 11539-11542, Jul 15 1989.

SOUCEK, J. et al. Immunosuppressive activity of bovine seminal ribonuclease and its mode of action. **Immunobiology**, v. 195, n. 3, p. 271-85, Aug 1996.

SOUZA, C. E. A. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim Reprod Sci**, v. 105, n. 1-2, p. 72-89, Apr 2008.

- SOUZA, C. E. A. et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4436-56, 2012-Jul-19 2012.
- SPROTT, L. R. et al. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 4, p. 795-8, Apr 2000.
- SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and Frozen Stallion Semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999.
- SRIVASTAVA, N. et al. Sequestration of PDC-109 protein improves freezability of crossbred bull spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 131, n. 1-2, p. 54-62, Mar 2012.
- STAFFORINI, D. M. et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 17895-17898, Jul 18 1997.
- STEPHAN, H. et al. Distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis. **Histochemistry and cell biology**, v. 106, n. 4, p. 383-93, Oct 1996.
- STERNLICHT, H. et al. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 20, p. 9422-6, Oct 15 1993.
- STOREY, B. T.; NOILES, E. E.; THOMPSON, K. A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 37, n. 1, p. 46-58, Aug 1998.
- STRADAIOLI, G. et al. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249-55, Apr 15 2007.
- STRAUS, J. W.; POLAKOSKI, K. L. Acrosin inhibition. Comparisons of membrane-associated and -solubilized enzyme. **J Biol Chem**, v. 257, n. 14, p. 7962-4, Jul 25 1982. I
- SULLIVAN, R.; FRENETTE, G.; GIROUARD, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 4, p. 483-91, Jul 2007.
- SULLIVAN, R. et al. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 35, n. 1, p. 1-10, Jul-Aug 2005.
- SUTOVSKY, P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 88-102, May 1 2003.
- SUTOVSKY, P. et al. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1625-37, Nov 2004.
- SUZUKI, K. et al. Bovine plasma protein-c inhibitor with structural and functional homologous properties to human plasma protein-c inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v. 107, n. 3, p. 381-388, Mar 1990.
- SYLVESTER, S. R. et al. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive-tract of the male-rat. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 1, p. 195-207, Jul 1991.
- TADA, T. et al. Immunohistochemical localization of zn-alpha-2-glycoprotein in normal human tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1221-1226, Sep 1991.
- THALER, C. J. et al. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 43, n. 4, p. 712-7, Oct 1990.
- THERIEN, I. et al. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 1, p. 97-106, May 2005.
- THERIEN, I.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 41-51, Jul 2001.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 4, p. 768-76, Oct 1998.

_____. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 3, p. 590-8, Sep 1999.

THIMON, V. et al. Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 5, p. 881-90, Nov 2005.

THYS, M. et al. Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin alpha(5)beta(1)) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 138, n. 3, p. 471-82, Sep 2009.

TJABRINGA, G. S. et al. Host defense effector molecules in mucosal secretions. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 151-8, Aug 1 2005.

TOMOMASA, H. et al. Lysosomal cysteine proteinases in rat epididymis. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 42, n. 3, p. 417-25, Mar 1994.

TOPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 159-170, Oct 2005.

TORRES-JUNIOR, J. R. S.; HENRY, M. Sexual development of Guzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 114-121, Apr-Jun 2005. ISSN 1806-9614. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOSIS:PREV200600551604 >.

TSUJII, T. et al. [Seminal lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) isozyme activity in infertile men]. **Hinyokika kiyo. Acta urologica Japonica**, v. 48, n. 4, p. 193-7, Apr 2002.

TULSIANI, D. R.; ORGEBIN-CRIST, M. C.; SKUDLAREK, M. D. Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 53, p. 85-97, 1998 1998.

TULSIANI, D. R. et al. Purification and characterization of two forms of beta-D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s). **The Biochemical journal**, v. 305 (Pt 1), p. 41-50, Jan 1 1995.

UEKI, M. et al. Genetic and expression analysis of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease I-like 1 and 2 genes. **Electrophoresis**, v. 31, n. 12, p. 2063-2069, 2010.

URADE, Y.; WATANABE, K.; HAYAISHI, O. Prostaglandin-d, prostaglandin-e, and prostaglandin-f synthases. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 12, n. 2-3, p. 257-273, Oct 1995.

UTLEG, A. G. et al. Proteomic analysis of human prostasomes. **The Prostate**, v. 56, n. 2, p. 150-61, Jul 1 2003.

VALENCIA, C. A. et al. Modulation of nucleobindin-1 and nucleobindin-2 by caspases. **Febs Letters**, v. 582, n. 2, p. 286-90, Jan 23 2008.

VAN TILBURG, M. F. et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1247-61, Jun 2013.

VAN TILBURG, M. F. et al. Variations in the protein profile of membrane-rich fractions of Saanen buck spermatozoa during dry and rainy seasons in Brazilian Northeast **In: 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**, v. 10, n. 3, 2013.

VAZQUEZ-ORTIZ, G. et al. Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. **BMC cancer**, v. 5, p. 68, 2005.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-79, Jan 1 2002.

- VILAGRAN, I. et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. **Theriogenology**, v. 80, n. 5, p. 443-50, Sep 15 2013.
- VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 1, p. 39-39, 2003 Apr 2003.
- VINSON, G. P. et al. Angiotensin II stimulates sperm motility. **Regulatory peptides**, v. 67, n. 2, p. 131-5, Dec 3 1996.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 1, p. 1-6, Jul 1998.
- VISCONTI, P. E. et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **Developmental Biology**, v. 214, n. 2, p. 429-43, Oct 15 1999.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilising ability of bull sperm. **Anim Reprod Sci**, v. 29, n. 3-4, p. 185-194, 1992.
- WAKABAYASHI, H. et al. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 955-7, May 1999.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, fertility, and development**, v. 7, n. 4, p. 871-91, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 481-92, Jul 2 2000.
- WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the messenger-rna of a new growth-factor from bovine seminal plasma - acidic seminal fluid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 183, n. 1, p. 232-237, Feb 28 1992.
- WHITLOCK, B. K. et al. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. **Theriogenology** v. 78, p. 737-746, 2012.
- WOLFSBERG, T. G. et al. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **The Journal of cell biology**, v. 131, n. 2, p. 275-8, Oct 1995.
- XIAO, F. et al. Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for sp family transcription factors. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 12, p. 2964-2978, Dec 2005.
- YAMAGATA, K. et al. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. **J Biol Chem**, v. 273, n. 17, p. 10470-4, Apr 24 1998.
- YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 2, n. 4, p. 371-2, Nov 1994.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 4-5, Jul 2011.
- YOSHIDA, H.; SATOH, K.; IMAIZUMI, T. Activity of platelet-activating-factor acetylhydrolase exists in red-cell membrane. **American Journal of Hematology**, v. 40, n. 1, p. 61-63, May 1992.
- YOSHIDA, K. et al. Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, n. 4, p. 391-7, Dec 2003.
- YU, H. H. et al. Stable overexpression of DJ-1 protects H9c2 cells against oxidative stress under a hypoxia condition. **Cell Biochemistry and Function**, Jan 1 2013.
- YUAN, Y. Y. et al. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 3, p. 904-13, Mar 2003.

YUASA, H. et al. Bovine protein C inhibitor has a unique reactive site and can transiently inhibit plasmin. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, n. 2, p. 262-267, Feb 2000.

ZALATA, A. et al. Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. **The Journal of urology**, v. 188, n. 4, p. 1260-4, Oct 2012.

ZALATA, A. et al. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 761-764, Apr 1996.

ZHANG et al. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 207-216, 1998.

ZHANG, X. Z.; XIONG, C. L. [Proteins in sperm and seminal plasma associated with human sperm resistance to cryopreservation]. **Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology**, v. 19, n. 3, p. 214-7, Mar 2013.

ZHAO, C. et al. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 2, p. 436-8, Feb 2007.

ZHOU, W.; FREED, C. R. DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity. **J Biol Chem**, v. 280, n. 52, p. 43150-8, Dec 30 2005.

ZIV, S.; RUFAS, O.; SHALGI, R. Cadherins expression during gamete maturation and fertilization in the rat. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 4, p. 547-56, Aug 2002.

CAPÍTULO II

PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A PORCENTAGEM DE ESPERMATOZOIDES NORMAIS DE TOUROS

Bos indicus DA RAÇA BRAHMAN

Proteínas do plasma seminal e suas associações com a porcentagem de espermatozoides normais de touros *Bos indicus* da raça Brahman

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo analisar o proteoma do plasma seminal de touros *Bos indicus*. Foram coletadas amostras de sêmen por eletroejaculação de 56 touros australianos da raça Brahman, com 24 meses de idade. As proteínas do plasma seminal foram separadas através de eletroforese bidimensional e identificadas por espectrometria de massa. A porcentagem de espermatozoides normais dos touros foi de $64 \pm 3,2$ %. Detectou-se, em média, 258 ± 12 spots nos géis 2-D do plasma seminal e um total de 108 spots foram identificados, correspondendo a 46 proteínas. As *Binder of sperm proteins* constituíram as proteínas mais abundantes no fluido seminal, correspondendo a 55,8% das intensidades totais dos spots detectados nos mapas, enquanto que as *spermadhesins* formaram o segundo grupo com maior expressão. Outras proteínas identificadas no plasma seminal dos touros Brahman incluem: *clusterin*, *albumin*, *transferrin*, *metalloproteinase inhibitor 2*, *osteopontin*, *epididymal secretory protein E1*, *apolipoprotein A-1*, *heat shock 70 kDa protein*, *glutathione peroxidase 3*, *cathelicidins*, *alpha-enolase*, *tripeptidyl-peptidase 1*, *zinc-alpha-2-glycoprotein*, *plasma serine protease inhibitor*, *beta 2-microglobulin*, *proteasome subunit beta type-4*, *actin*, *cathepsins*, *nucleobinding-1*, *protein S100-A9*, *hemoglobin subunit alpha*, *cadherin-1*, *angiogenin-1*, *fibrinogen alpha and beta chain*, *ephrin-A1*, *protein DJ-1*, *serpin A3-7*, *alpha-2-macroglobulin*, *annexin A1*, *complement factor B*, *polymeric immunoglobulin receptor*, *seminal ribonuclease*, *ribonuclease-4*, *prostaglandin-H2 D-isomerase*, *platelet-activating factor acetylhydrolase* e *phosphoglycerate kinase 1*. O presente estudo também reporta que a intensidade de spots identificados como *apolipoprotein A-1*, *glutathione peroxidase 3*, *protein DJ-1*, *phosphoglycerate kinase 1* e *secretoglobin family 1D member* estão associadas positivamente com a morfologia espermática dos touros aos 24 meses de

idade (PEN24). Spots cujas intensidades apresentaram relação negativa com esta variável foram identificados como *clusterin*, *apolipoprotein A-I*, *epididymal secretory protein E1* e *metalloproteinase inhibitor 2 precursor*. Em conclusão, este trabalho descreve o proteoma do fluido seminal de touros *Bos indicus*, baseado em um representativo número de animais da raça Brahman, criados no Nordeste da Austrália, região de clima tropical. Proteínas relacionadas significativamente com a variável PEN24 podem servir de marcadores moleculares durante processos de avaliação da fertilidade potencial dos reprodutores.

Palavras-chaves: *Bos indicus*, eletroforese, espermatozoide, proteoma

ABSTRACT

The present study describes the seminal plasma proteome of *Bos indicus* bulls. Fifty-six, 24-month old Australian Brahman sires were evaluated and subjected to electroejaculation. Seminal plasma proteins were separated by 2-D SDS-PAGE and identified by mass spectrometry. The percentage of morphologically normal sperm of the bulls was 64 ± 3.2 %. A total of 258 ± 12 spots were detected in the 2-D seminal plasma maps and a total of 108 spots were identified, corresponding to 46 proteins. Binder of sperm proteins accounted for 55.8% of total spots intensities detected in the maps and spermadhesins comprised the second most abundant constituents. Other proteins of the *Bos indicus* seminal plasma include clusterin, albumin, transferrin, metalloproteinase inhibitor 2, osteopontin, epididymal secretory protein E1, apolipoprotein A-1, heat shock 70 kDa protein, glutathione peroxidase 3, cathelicidins, alpha-enolase, tripeptidyl-peptidase 1, zinc-alpha-2-glycoprotein, plasma serine protease inhibitor, beta 2-microglobulin, proteasome subunit beta type-4, actin, cathepsins, nucleobinding-1, protein S100-A9, hemoglobin subunit alpha, cadherin-1, angiogenin-1, fibrinogen alpha and beta chain, ephirin-A1, protein DJ-1, serpin A3-7, alpha-

2-macroglobulin, annexin A1, complement factor B, polymeric immunoglobulin receptor, seminal ribonuclease, ribonuclease-4, prostaglandin-H2 D-isomerase, platelet-activating factor acetylhydrolase, and phosphoglycerate kinase 1. It is reported that the intensity of spots identified as apolipoprotein A-I, glutathione peroxidase 3, protein DJ-1, phosphoglycerate kinase 1 e secretoglobin family 1D member were positively related to the percentage of normal sperm at 24 months (PNS24). Spot showing negative association with this variable were identified as clusterin, apolipoprotein A-I, epididymal secretory protein E1 and metalloproteinase inhibitor 2 precursor. In conclusion, the present study describes the major seminal plasma proteome of *Bos indicus* sires, based on the group of animais representing the Brahman herds raised in the Northeast of Australia, a region of tropical climate. Proteins related to PNS24 could serve as molecular markers of the potential fertility of bulls.

Keywords: *Bos indicus*, electrophoresis, proteome, sperm

INTRODUÇÃO

O plasma seminal é uma secreção complexa formada pela combinação de fluidos originários dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias, servindo como meio e veículo para os espermatozoides durante a ejaculação e migração no trato reprodutivo feminino até o momento da fertilização. Na atualidade, diversos estudos sobre o proteoma dos fluidos do trato reprodutivo na espécie bovina foram desenvolvidos em *Bos taurus*, onde foi descrita uma significativa diversidade de proteínas e suas respectivas funções (KILLIAN et al., 1993; MORTARINO et al., 1998; KELLY et al., 2006; MOURA et al., 2007b; MOURA et al., 2010; DRUART et al., 2013). Baseado nestes e em outros estudos, as proteínas presentes no plasma seminal podem atuar na proteção do espermatozoide contra o estresse oxidativo durante o trânsito epididimário e armazenamento na cauda deste órgão, bem como contra os ataques do sistema imune no trato reprodutivo feminino

(YANAGIMACHI, 1994; KRAUS et al., 2005). Tem sido também demonstrado que os componentes proteicos do fluido do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias dão suporte à motilidade espermática através do fornecimento de enzimas e substratos (FINK et al., 1989). Durante o trânsito espermático no trato reprodutivo feminino, proteínas específicas do plasma seminal ligam-se à membrana espermática e desempenham papel importante em eventos como a capacitação e interação entre o espermatozoide e o epitélio do oviduto (THERIEN et al., 1998; 1999; GWATHMEY et al., 2006). Outras proteínas do plasma seminal possuem a capacidade de interagir tanto com o espermatozoide como com o oócito, participando da reação acrossômica, fertilização e também no desenvolvimento embrionário inicial (GONCALVES et al., 2007; GONCALVES et al., 2008).

A divergência que deu origem às duas subespécies de gado doméstico (*Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*) provavelmente ocorreu há cerca de 330.000 anos (ACHILLI et al., 2008). Os *Bos indicus* originalmente estabelecidos no continente asiático foram trazidos no início do século XX para países como Austrália, Estados Unidos e Brasil, pois se pensava que os atributos desses animais seriam compatíveis com o clima e com as condições de pastagem de algumas regiões desses países. Atualmente, os *Bos indicus* são predominantes dentre as raças de bovinos de corte criadas nas áreas tropicais das citadas nações e o Brahman, uma típica raça do grupamento *Bos indicus*, constitui uma das mais comuns no Norte da Austrália, principalmente devido à resistência a ectoparasitas, tolerância ao calor e pastagens de regiões secas (BORTOLUSSI et al., 2005). Apesar da importância econômica e a excepcional fisiologia e comportamento desses animais adaptados às condições tropicais, o conhecimento sobre a sua biologia reprodutiva é ainda limitado, especialmente nos machos.

A avaliação andrológica de touros tem sido estabelecida como uma abordagem capaz de determinar a capacidade potencial de serviço do reprodutor através da avaliação física e qualidade do sêmen (KASTELIC; THUNDATHIL, 2008). A porcentagem de

espermatozoides morfolologicamente normais (PEN) é uma característica seminal que tem sido correlacionada com a produção de bezerras/touro em rebanhos da raça Brahman (HOLROYD et al., 2002). Recentemente, um estudo sobre genética de touros australianos tropicalmente adaptados também identificou a qualidade do sêmen como um dos principais determinantes da fertilidade destes animais, sendo a PEN a característica seminal de maior herdabilidade (CORBET et al., 2013). No entanto, como já discutido anteriormente, embora determinados parâmetros como a percentagem de espermatozoides morfolologicamente normais apresentem relação com a fertilidade dos touros, em alguns grupamentos genéticos, certamente outros fatores, como as proteínas do fluido seminal também contribuem para a definição das diferenças entre os índices de fertilidade dos touros. Dessa forma, compreender as funções fisiológicas e as relações entre as proteínas do plasma seminal e as características espermáticas constitui um passo importante para a identificação de potenciais biomarcadores da fertilidade masculina. Até o presente momento, apenas 11 proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* foram identificadas (ASSUMPCAO et al., 2005) e um único estudo conduzido em Nelore (JOBIM et al., 2004) demonstrou associações entre as proteínas do plasma seminal e parâmetros espermáticos pós-criopreservação. Portanto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de descrever o proteoma do plasma seminal e identificar possíveis associações entre as proteínas do plasma seminal e a percentagem de espermatozoides morfolologicamente normais em touros *Bos indicus*, da raça Brahman.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, coleta e análise das amostras de sêmen

Utilizou-se, no presente estudo, um grupo de 56 animais, selecionados a partir de um subconjunto de touros da raça Brahman (n=109) pertencentes ao projeto que envolvia a avaliação genética de características de produção e qualidade de carne e fertilidade, realizado

no programa desenvolvido pelo *Beef CRC*, Austrália (Cooperative Research Centre for Beef Genetic Technologies) (JOHNSTON et al., 2009; CORBET et al., 2013).

Foram mensurados peso vivo e circunferência escrotal nos animais aos 24 meses de idade, seguido de coleta de sêmen por eletroejaculação (BURNS et al., 2013). As amostras de sêmen foram avaliadas por microscópio de contraste de fase (x400), acoplado a uma placa aquecedora a 37 °C para determinação da porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva. Diluiu-se uma alíquota da amostra de sêmen em tampão fosfato salino com 0,2% de glutaraldeído e avaliou-se a morfologia espermática através da contagem de 100 células por lamina, em microscopia com uma lente objetiva de contraste de interferência diferencial (x1000). A porcentagem de espermatozoides normais aos 24 meses (PEN24) foi determinada pelo mesmo técnico morfolologista credenciado ao laboratório de análise de sêmen da Universidade de Queensland (FORDYCE et al., 2006). A amostra de sêmen restante foi centrifugada a $700 \times g$ durante 10 minutos (4°C) para separar o plasma seminal dos espermatozoides, cada fração foi então transferida para tubos criogênicos e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido. Os procedimentos de coleta e avaliação do sêmen foram aprovados pelo *J M Rendel Laboratory Animal Experimental Ethics Committee (CSIRO, Queensland)*, sob os números *RH198/04* e *RH219/06*.

Determinação da concentração de proteínas no plasma seminal

As amostras de plasma seminal foram descongeladas e submetidas a uma nova centrifugação a $10.000 \times g$, 60 minutos, 4°C (MOURA et al., 2006b). Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a determinação de proteína total (BRADFORD, 1976) e o restante das alíquotas, armazenadas a - 80°C. Resumidamente, uma curva analítica de calibração foi obtida a partir de soluções padrões de albumina sérica bovina (Sigma-Audrich, AU) e as amostras, mensuradas em triplicata depois de diluídas numa proporção de 1:80 (v/v)

em água milli-Q (Millipore, USA). As amostras já diluídas (100 µL) foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Bradford e lidas depois de 10 minutos a 595 nm (Ultraspec III, SG Lifesciences, USA). Um número significativo de amostras de plasma seminal foram inicialmente avaliados (n = 109) sendo selecionados apenas os animais que apresentavam uma concentração mínima de proteínas totais de 12 mg/mL.

Eletroforese bidimensional

Uma amostra de plasma seminal de cada touro, contendo um total de 750 µg de proteína, foi adicionada ao tampão de reidratação (7 M urea, 2 M tiourea, 65 mM DTT [dithiothreitol], 0,5% v/v anfólitos livres [IPG buffer, pH 3–11], 0,5% w/v CHAPS [3-(3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propanesulfonate)] e traços de azul de bromofenol) suficientes para completar um volume de 450 µL de tampão mais proteína. A solução contendo as proteínas foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubadas com tiras de 24 cm IPG (*immobilized pH gradient*; pH 3 to 11, linear; GE Lifesciences, USA) por aproximadamente 20 h. A focalização isoeétrica foi conduzida em um equipamento Ettan™ IPGphor 2™ (GE Lifesciences, USA) a 20 °C com a seguinte programação: 100 V por 2 h, 250V por 2 h, 1000 V por 1 h, 5000 V por 2 h em gradiente, 5000 V por 8 h (46.700 V totais, aproximadamente) além de um passo adicional de 30 V para evitar a difusão proteica no final da focalização. Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio I durante 15 minutos (6 M urea, 50 mM Tris–HCl pH 8.8, 29.3% v/v glicerol, 2% w/v SDS, 1% w/v DTT) e reequilibradas por mais 15 minutos com o tampão II (tampão de equilíbrio I contendo 2,5% w/v de iodoacetamida no lugar do DTT). Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram fixadas com agarose (5% em tampão de corrida) no topo do gel de poliacrilamida (15%) em uma cuba modelo *Caster Ettan Dalt II system* (Amersham Pharmacia Biotech,

USA) acoplada a um tanque e corrida a 40 mA por gel (Hoefler SE 600; GE Lifesciences, USA).

Coloração dos géis

Os géis foram fixados em solução de contendo 40% metanol e 10% de ácido acético por 1 h e corado *overnight* com Sypro Ruby (Life technologies, Invitrogen, USA). Após o passo de coloração, os géis foram descorados por 2 h em solução de metanol a 10% e ácido acético a 7% em água destilada e escaneados utilizando Typhoon (Typhoon 9400, Variable Mode Manager Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, USA). As imagens foram salvas em arquivos no formato (.tiff) para análises no software.

Análises das imagens dos géis pelo aplicativo PDQuest

De acordo com metodologia previamente descrita (MOURA et al., 2006b; MOURA et al., 2007b), todos os mapas bidimensionais foram avaliados em um único *match set* utilizando o aplicativo PDQuest versão 8.0 (Bio Rad, USA). Um gel representativo foi criado com base nos géis de todos os 56 indivíduos e spots presentes de forma consistente nos mapas também foram adicionados ao gel sintético. Proteínas presentes em diferentes regiões dos géis foram utilizadas como marcos de localização de forma a permitir o alinhamento correto de cada spot nos diferentes géis. A quantificação dos spots foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, conforme definido pelo aplicativo.

Digestão trípica das proteínas e limpeza das amostras (Zip-tip clean up)

Após a análise dos géis corados com Sypro Ruby através do aplicativo PDQuest, amostras do plasma seminal foram novamente separadas por eletroforese 2-D para coloração com Coomassie G-250, utilizando-se o protocolo previamente descrito por (CANDIANO et

al., 2004; SOUZA et al., 2012). Em resumo, após a segunda dimensão, os géis foram lavados três vezes (20 minutos cada) com uma solução contendo ácido fosfórico (2%) e etanol (30%) em água, seguidos de mais três lavagens com ácido fosfórico (2%) em água. Os géis foram imersos por 72 h em solução com ácido fosfórico (2%), etanol (18%) e sulfato de amônio (15%), adicionados de 2 mL de solução de Coomassie G-250 (2% w/v).

Após o processo de coloração com Coomassie G-250 e alinhamento destes géis com as imagens geradas como o corante Sypro Ruby e no aplicativo PDQuest, os spots de interesse foram cortados individualmente de três géis em pedaços de aproximadamente 1 mm³ e completamente descorados com 400 µL de solução contendo acetonitrila 50% (ACN) /bicarbonato de amônio (50% a 25 mM, pH 8,0) ficando nesta solução aproximadamente 16 horas. Os spots foram desidratados duas vezes com 200 µL de acetonitrila absoluta durante 5 minutos e secos à temperatura ambiente. As proteínas foram incubadas por, aproximadamente, 20 horas, a 37° C, com solução contendo tripsina (166 ng/spot; Promega, cat. # v5111, Madison, WI, USA), ácido acético 50 mM (solução estoque 200 ng/µL) e diluída com bicarbonato de amônio 50 mM. Os peptídeos foram extraídos com 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA), 50% de ACN em solução de bicarbonato de amônio (50 mM) por 30 minutos, sendo submetidos a três lavagens. Os extratos foram acondicionados em micro tubos (Eppendorf, USA) e concentrados a vácuo até o volume final de 10 µL. Um pedaço de gel sem spots e um spot referente a albumina proveniente do marcador molecular usado na segunda dimensão foram submetidos ao mesmo procedimento e utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Após a extração dos peptídeos dos géis, as amostras foram limpas com uma ponteira C18 (Millipore Badfor, USA). A ponteira foi umedecida com ACN 100% (3 x 10 µL), foi equilibrada com uma solução contendo 5% de ACN / 0,1% de TFA (3 x 10 µL) e logo após as amostras foram aspiradas (3 x aspiradas/eluidas). As ponteiras foram lavadas com solução contendo 5% de ACN / 0,1% de

TFA (3 x 10 μ L) logo depois as amostras foram eluidas com uma solução contendo 80% de ACN / 0,1 de TFA (10 μ L) dentro de um novo tubo e diluída com água milliQ suficiente para um volume final de 100 μ L (NOUWENS et al., 2000).

Identificação das proteínas utilizando espectrometria de massas e busca de dados

Matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-ToF)

Os *spots* foram identificados através da utilização de um espectrômetro de massas Voyager DE STR MALDI-TOF (ABSciex, EUA) usando ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico como a matriz, como descrito anteriormente (MELIAN et al., 2010) com modificações. Os espectros de massa foram adquiridos no modo de refletor de íons positivos, 20000 V de tensão de aceleração com um mínimo de 500 disparos de laser por espectro. Sempre que possível, (foram usadas m / z 842,5 e 2211,1) uma calibração interna utilizando os peptídeos da auto-digestão da tripsina. Para os espectros restantes, uma calibração externa foi usada com o ACTH e com os peptídeos da angiotensina II.

Electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-qTOFMS)

Peptídeos foram separados utilizando cromatografia de fase reversa num sistema de Shimadzu Prominence nano LC, como descrito anteriormente (KAPPLER; NOUWENS, 2013a) com modificações. Usando um fluxo de 30 mL/min, as amostras foram dessalinizadas numa coluna Agilent C18 (0,3 x 5 mm, 5 μ m) durante 3 min, seguido por separação numa coluna Vydac Everest C18 (300 A, 5 μ m, de 150 mm x 150 μ m) a um de fluxo de 1 mL/min . Um gradiente de 10-60% de tampão B ao longo de 30 min, em tampão A que consistia em 1% de ACN/TFA a 0,1% e tampão B de 80% de ACN/0,1% de TFA foi utilizado para separar os peptídeos. Os peptídeos eluidos foram diretamente analisadas em um instrumento TripleTof 5600 (ABSciex, EUA) utilizando uma interface de Nanospray III. As

configurações de gás e tensão foram ajustadas conforme a necessidade. A varredura do MS TOF de m/z 350-1800 foi realizada por 0,5 s, seguido por informações aquisição dependente de 20 peptídeos variando m/z 40-1800 (0,05 s por espectros). Os dados adquiridos foi convertido para formato genérico Mascot (MGF) usando o software v1.1 Peakview (ABSciex, EUA) antes de realizar a pesquisa no banco de dados . Os arquivos foram buscados utilizando uma versão local do MASCOT contra SwissProt e NCBIInr usando como taxonomia , mamíferos, acessado através do Australian Proteomics Computational Facility (www.apcf.edu.au). Os parâmetros utilizados para a pesquisa incluíram a tripsina como enzima com o máximo de 1 clivagem perdida, a tolerância de erro de 50 ppm (MS) e 0,1 Da (MS/MS). Carbamidometilação da cisteína (fixo) e a oxidação de metionina foram usadas modificações (variável).

Ontologia gênica

Os dados obtidos com a identificação das proteínas do plasma seminal por espectrometria de massa e pesquisa com o sistema “MASCOT” foram analisados utilizando o aplicativo para a pesquisa de anotações de proteínas (STRAP). Termos para a ontologia gênica associadas a processo biológico e função molecular foram obtidos a partir UniProtKB e EBI GOA databases (BHATIA et al., 2009).

Análise de interações entre proteínas

As interações proteína-proteína demonstradas em rede de conexões foram conduzidas utilizando o STRING STRING (<http://string-db.org>) versão 9.0 (SNEL et al., 2000). Esta base de dados é composta por interações entre proteínas conhecidas e associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). Procedeu-se com as análises de interações para as proteínas mais abundantes presentes no plasma seminal como as *BSPs* (*BSP1*, 3 e 5), *spermadhesina*,

albumin, *TIMP-2* e *clusterin*. Aplicou-se a análise do STRING com uma restrição de no máximo 10 interações, padrão médio de confiança e avaliação de proteínas da espécie bovina ou humana.

Análise estatística

Antes da inclusão das proteínas do plasma seminal nos modelos estatísticos, um *Linear Mixed Model* de variância usando *ASReml_R* (Versão 3.0), com modelo animal completo (ou seja, incluindo os dados de pedigree no modelo), foi aplicado para investigar quaisquer outros efeitos fixos ou aleatórios significativos que pudessem influenciar a variável PEN24. Os efeitos fixos considerados no modelo incluíram a data de nascimento do touro, a origem do touro, origem da matriz, a idade precisa do touro no momento da coleta de sêmen e o grupo do animal. O efeito aleatório incluiu o efeito genético aditivo dos animais. Dentre todos os efeitos fixos, apenas a data de nascimento do touro e a origem tiveram efeitos significativos sobre a PEN24. Estes dois efeitos fixos e o efeito genético aditivo dos animais (efeito aleatório) foram, então, incluídos em análises posteriores. Ambas as relações lineares e não-lineares entre os *spots* proteicos do plasma seminal e a PEN24 foram analisados por meio de modelos de regressão simples e múltiplo, respectivamente. Para um modelo de regressão simples, um *spot* proteico do plasma seminal (SPP) individualmente foi ajustado como co-variável.

O modelo estatístico adotado está descrito abaixo:

$$\text{PEN24} = \text{data de nascimento do touro} + \text{origem} + \text{animal} + \text{LogSPP (ou SQRTSPP)} + \text{erro},$$

LogSPP (SQRTSPP) refere-se à transformação logarítmica ou transformação da raiz quadrada dos dados das proteínas (SPP).

Entendendo que a análise de regressão simples, em geral, não leva em consideração as relações entre SPPs, fez-se necessário uma análise mais aprofundada de regressão múltipla

para detectar quaisquer possíveis interações entre SPPs, bem como as relações de curvatura entre SPPs e a PEN24. Após SPPs terem sido identificados a partir da análise de regressão simples, a combinação dos efeitos foram então avaliados com três modelos de regressão múltipla. Dois modelos de regressão múltipla não-paramétrico utilizando o programa “R” (Versão 2.13.1), chamado de *Tree model (recursively partitioning response variables into subsets)* (BREIMAN et al., 1984) e o *Generalised Additive Model (GAM)*(HASTIE; TIBSHIRANI, 1990) foram usados para detectar as potenciais interações entre as SPPs e as relações de curvatura entre SPPs e a PEN24. Com base nos resultados dos modelos *Tree* e *GAM*, um método de *step-wise* foi utilizado para um modelo de regressão múltipla generalizado como a finalidade de obter os parâmetros finais associados aos SPPs para a variável PEN24.

Validação da identidade dos spots associados com a porcentagem de espermatozoides normais

Após a definição dos modelos de regressão e associações entre as intensidades dos spots no. 52, 46, 85, 25, 53 e 20 e a variável PEN24, procedeu-se a uma validação final da identidade destes spots. Para tanto, estes seis spots foram cortados novamente dos géis, corados com Coomassie blue, digeridos e analisados através de espectrometria de massa, conforme descrito acima.

RESULTADOS

Parâmetros seminais

Os dados de peso vivo, circunferência escrotal, parâmetros espermáticos e proteína total no plasma seminal dos touros utilizados no presente estudo estão mostrados na Tabela 1. A distribuição da porcentagem de espermatozoides normais nos 56 touros aos 24 meses de

idade diante do grupo onde foram originalmente selecionados (n=109) está mostrada na Figura 1. A média de PEN24 foi de 64% para os 56 touros incluídos no estudo.

Tabela 1. Peso corporal, circunferência escrotal, parâmetros espermáticos e proteína total no plasma seminal dos touros *Bos indicus* aos 24 meses de idade (média \pm EP).

Características	Médias (\pmEP)	Min.	Max.
Peso corporal (kg)	353 \pm 4,9	272	432
Circunferência escrotal (cm)	29 \pm 0,3	24	34
Motilidade progressiva (%)	70 \pm 2,3	30	95
Espermatozoides normais (%)	64 \pm 3,2	6	94
Proteína total no plasma seminal (mg/mL)	50,6 \pm 1,8	12,0	101,3

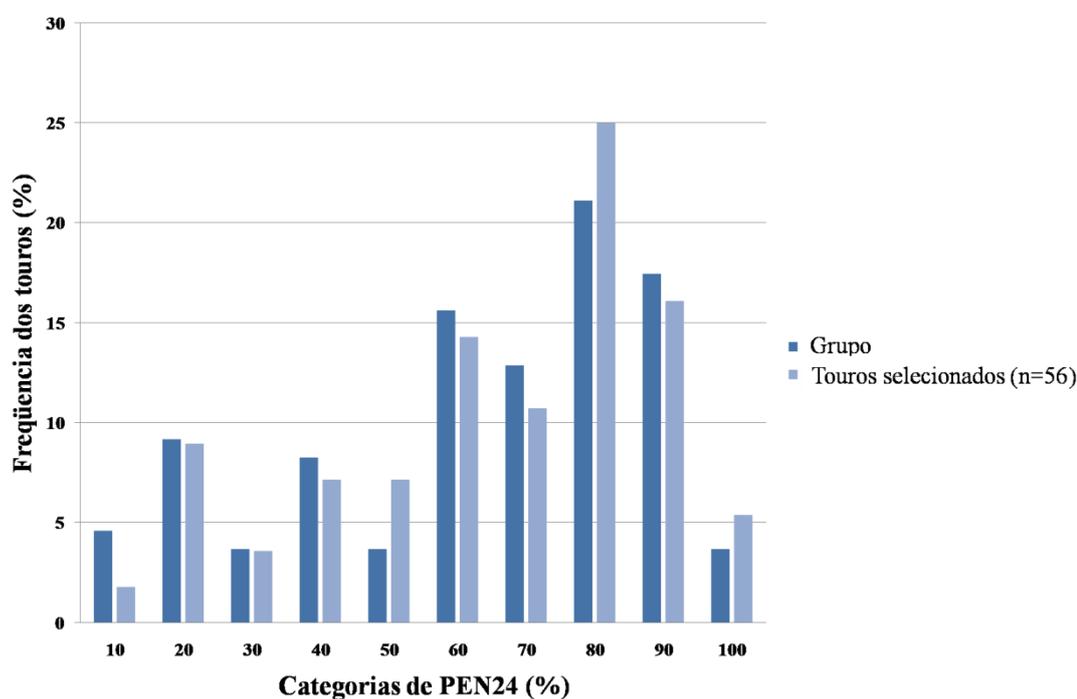


Figura 1. Distribuição dos touros Brahman selecionados aos 24 meses (n= 56) diante do grupo original de touros (n= 109), em categorias de porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (PEN24).

Identificação das proteínas do plasma seminal e bioinformática

Em média, foram detectados 258 ± 12 spots através da análise com o aplicativo PDQuest, com base na combinação de todos os 56 membros do *match set*. Os spots presentes no gel *master* (Figura 2A) corresponderam aos spots detectados no gel de referência (Figura 2B) e spots adicionados de outros membros do *match set* (Figura 2C e Figura suplementar 1). Um total de 108 spots foi identificado por espectrometria de massas, correspondendo a 46 diferentes proteínas (Figura 2 e Tabela 2). Diversos spots dos mapas do plasma seminal foram identificados como *Binder of Sperm Proteins (BSP)*, incluindo a *BSP1* (spots 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 21 e 26), *BSP3* (spots 8, 9, 11, 21, 26 e 35) e *BSP5* (spots 44, 54, 55, 56, 57 e 58), como mostrados na Figura 2A e Tabela 2. As intensidades dos vinte e dois spots identificados como *BSPs* corresponderam a 55,8% do total de todas as intensidades dos spots detectados pelo PDQuest, define as *BSPs* como o grupo de proteínas mais abundantes. Identificou-se como o segundo grupo de proteínas de maior expressão no plasma seminal dos touros aquele formado pela *spermadhesin 1* (spots 1, 2, 3, 8 e 9) e *spermadhesin Z13* (spots 10, 11, 14, 15, 16, 21 e 43), conforme mostrado na Figura 2A e Tabela 2. Juntos, estes spots representam 9,6% do total das intensidades dos spots detectados nos mapas bidimensionais.

Proteínas com múltiplas isoformas também foram identificadas nos géis do fluido seminal, incluindo a *clusterin*, *albumin*, *transferrin* e *metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP-2)* (Figura 2A; Anexo I), além de *osteopontin*, *epididymal secretory protein E1*, *apolipoprotein A-1*, *heat shock 70 kDa protein*, *glutathione peroxidase 3*, *cathelicidins*, *alpha-enolase*, *tripeptidyl-peptidase 1*, *zinc-alpha-2-glycoprotein*, *plasma serine protease inhibitor*, *beta 2-microglobulin*, *proteasome subunit beta type-4*, *actin*, *cathepsins*, *nucleobinding-1*, *protein S100-A9*, *hemoglobin subunit alpha*, *cadherin-1*, *angiogenin-1*, *fibrinogen alpha and beta chain*, *ephrin-A1*, *protein DJ-1*, *serpin A3-7*, *alpha-2-macroglobulin*, *annexin A1*, *complement factor B*, *polymeric immunoglobulin receptor*, *seminal ribonuclease*,

ribonuclease-4, prostaglandin-H2 D-isomerase, platelet-activating factor acetylhydrolase e phosphoglycerate kinase 1 (Figura 2A; Tabela 2).

As categorias e termos da ontologia gênica para processos biológicos, função molecular e componentes celulares das proteínas do plasma seminal dos touros *Bos indicus* estão mostrados na Figura 3. As funções moleculares mais importantes relacionadas com as proteínas identificadas são de ligação e atividade catalítica, seguidas por regulação de atividade enzimática e atividade antioxidante. Os dois principais processos biológicos das proteínas identificadas no plasma seminal foram caracterizados como processo celular e regulação. Com relação ao componente celular, definiu-se as proteínas principalmente como extracelulares e, em seguida, como componentes de membrana plasmática.

Com base na análise de rede de interações proteína-proteína, dos principais constituintes do plasma seminal (*BSPs, spermadhesins, albumin, TIMP-2 e clusterin*) foi encontrado um diversificado leque de interações, incluindo proteínas ligadoras de fosfolipídios, proteases e seus inibidores, enzimas e fatores de crescimento (Figura 4).

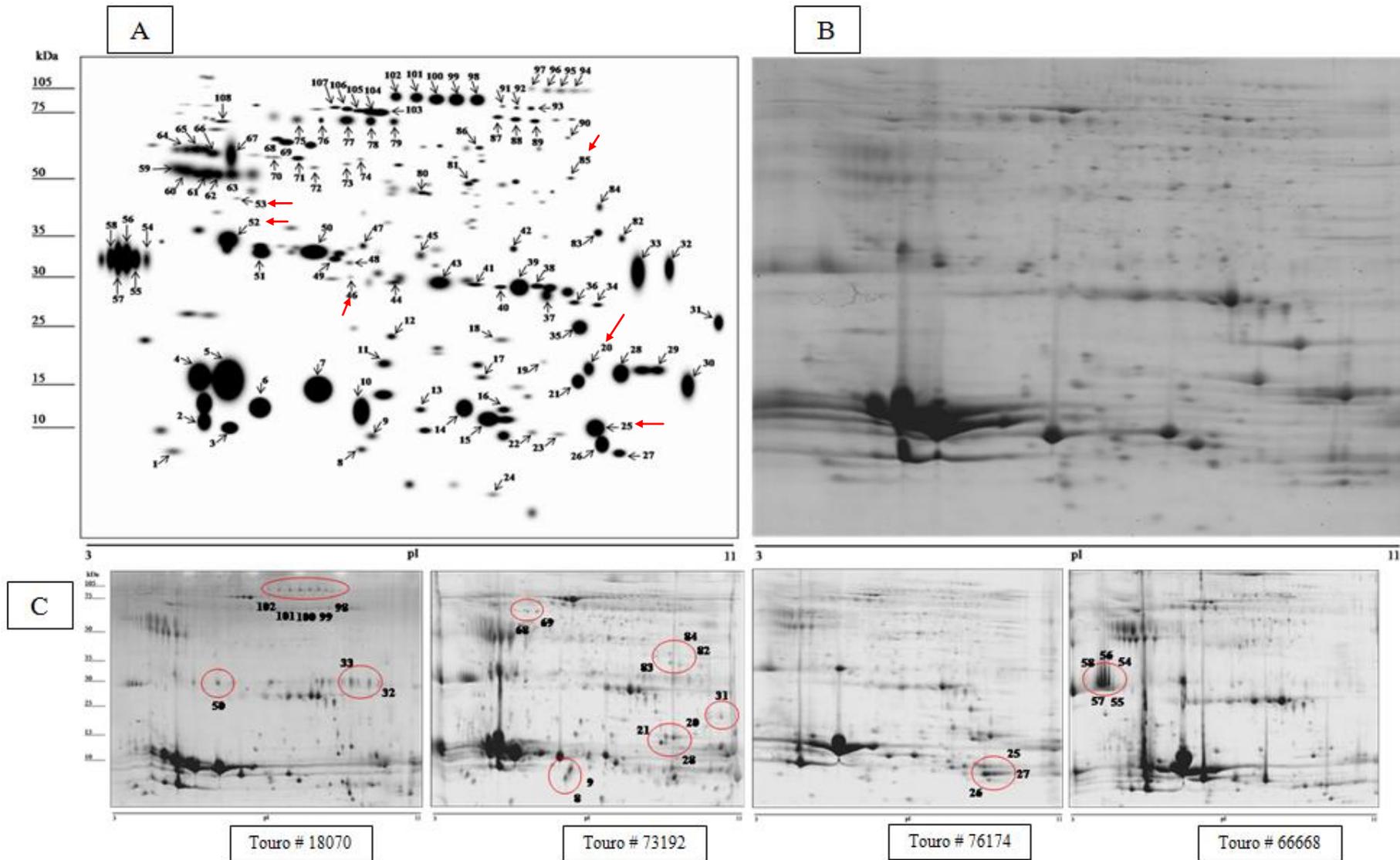


Figura 2. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus*. (A) representa o gel *master* gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, EUA), com base na combinação de todos os géis utilizados no estudo. (B) corresponde ao gel referência a partir do qual o gel mestre foi gerado. (C) representa géis com identificação dos principais grupos de *spots* adicionados no gel mestre. As proteínas foram coradas com *Sypro Ruby* e identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa (*MALDI-TOF* e *ESI-QUAD-TOF*). Os números dos *spots* correspondem aos mostrados na Tabela 1 e Tabela 2. Setas em cor vermelha indicam spots cujas intensidades apresentaram relação significativa com a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (PEN24) nos ejaculados dos touros Brahman aos 24 meses de idade, de acordo com modelos de regressão descritos na Figura 6 e Tabela 4.

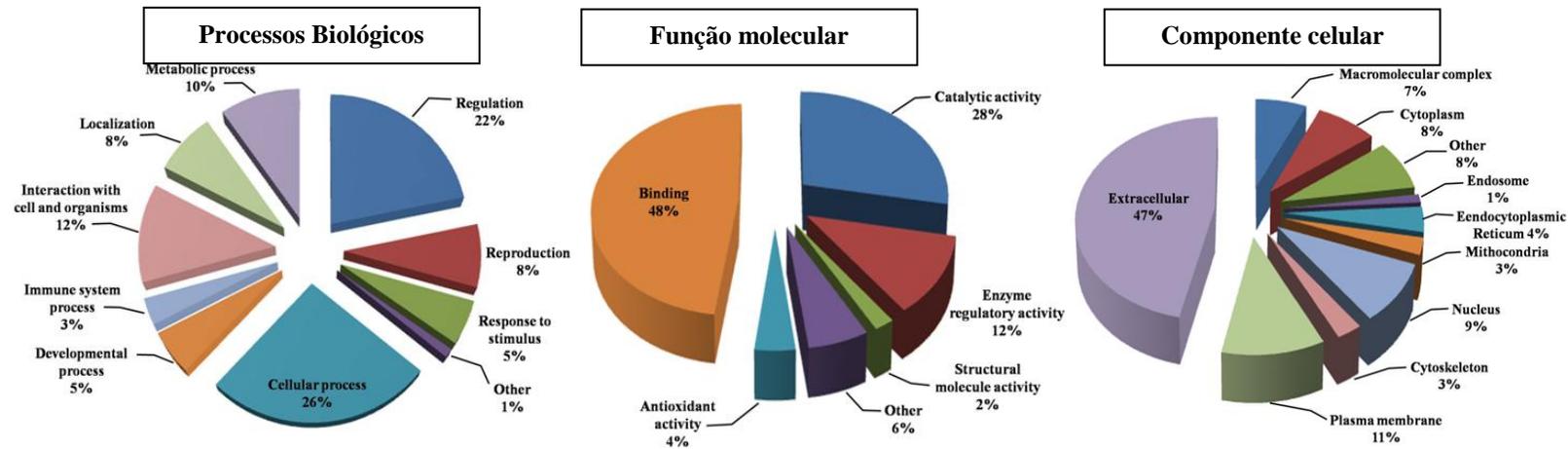


Figura 3. Anotações da ontologia gênica do proteoma do plasma seminal de touros *Bos indicus* em função do processo biológico (A), função molecular (B) e componente celular (C). Os dados gerados com a identificação das proteínas foram analisados com aplicativo STRAP para a pesquisa de anotações. Os termos da ontologia gênica foram obtidos a partir do UniProtKB e EBI GOA.

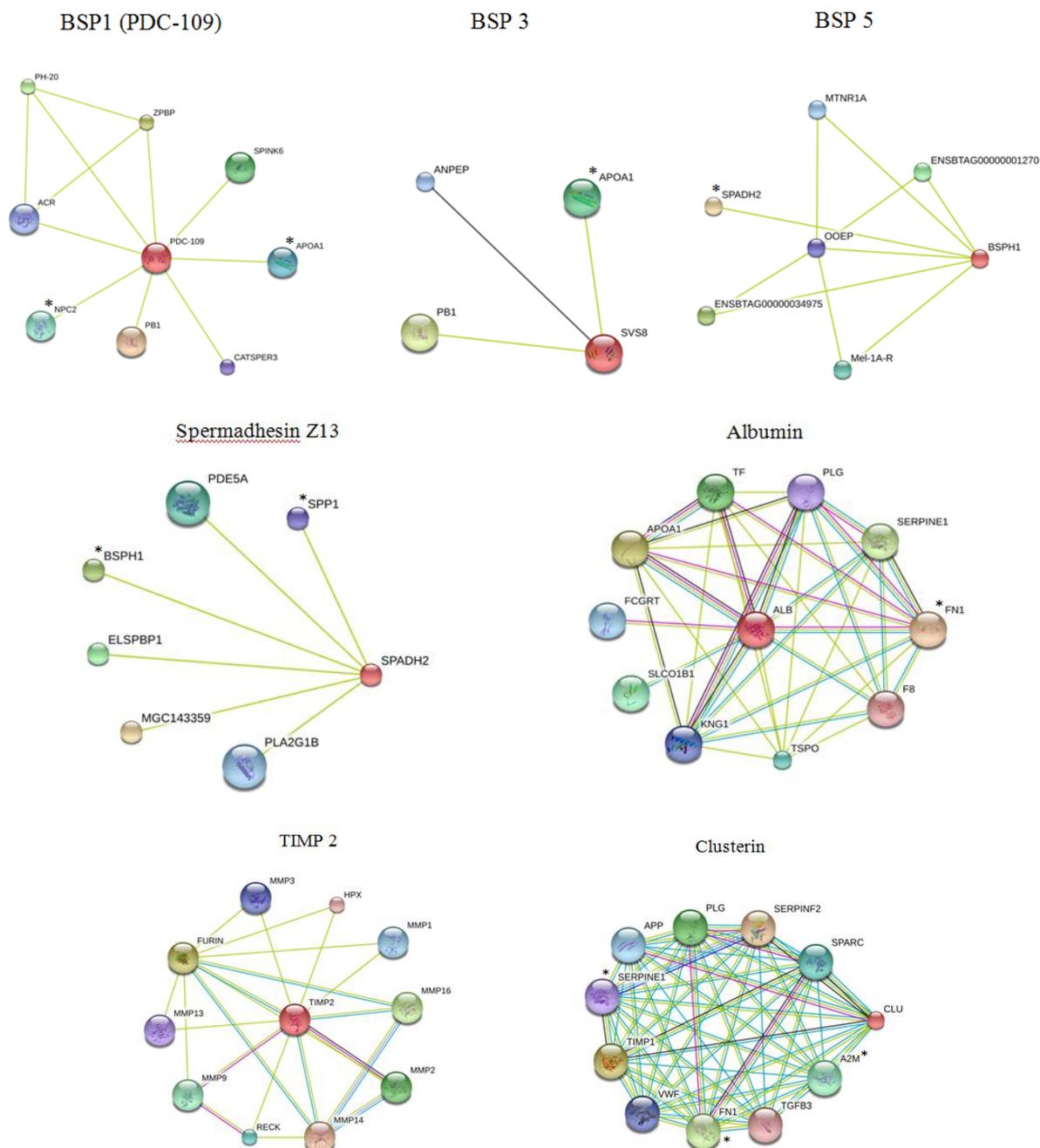


Figura 4. Análise in-silico da interação de proteínas. As proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* foram analisadas por meio de interações proteínas-proteína com o aplicativo STRING. A pesquisa de interação foi fixada em média confiança com uma restrição de no máximo 10 interações. *BSP1 (PDC-109)* - *Binder of Sperm Protein 1*; *SVS8* - *Binder of Sperm Protein 3*; *SPADH2* - *Spermadhesin Z13*; *ALB* - *Albumin*; *TIMP 2* - *metalloproteinase inhibitor 2*; *CLU* - *Clusterin*. *Proteínas identificadas no plasma seminal dos touros *Bos indicus* mostradas na Figura 1 e Tabela 2.

Associações entre as proteínas do plasma seminal e a porcentagem de espermatozoides normais aos 24 meses de idade

Análise de regressão múltipla

O modelo não-paramétrico *Tree Model*, utilizando as transformações de Log e raiz quadrada, revelaram uma relação hierárquica e complexa entre várias proteínas. A Figura 5 ilustra as relações entre os 6 SPPs (transformados por Log) e a PEN24. O *spot* 53 foi identificado como o mais importante SSP capaz de influenciar a variável PEN24, seguido pelos *spots* 52, 46 e 20. Os SPPs 25 e 85 também influenciaram as variações no parâmetro PEN24, porém com menor significância (Figura 5). Os resultados indicam que, selecionando os animais com base no $\text{Log}(\text{spot } 53) < 6,87$, $\text{Log}(\text{spot } 52) > 6,7$ e $\text{Log}(\text{spot } 46) > 5,58$, espera-se aumentar a PEN24 para 83,3% (Figura 5). Os mesmos quatro SPPs (53, 52, 46 e 20) também foram identificados no *Tree Model* quando foi utilizado a transformação da raiz quadrada (dados não apresentados).

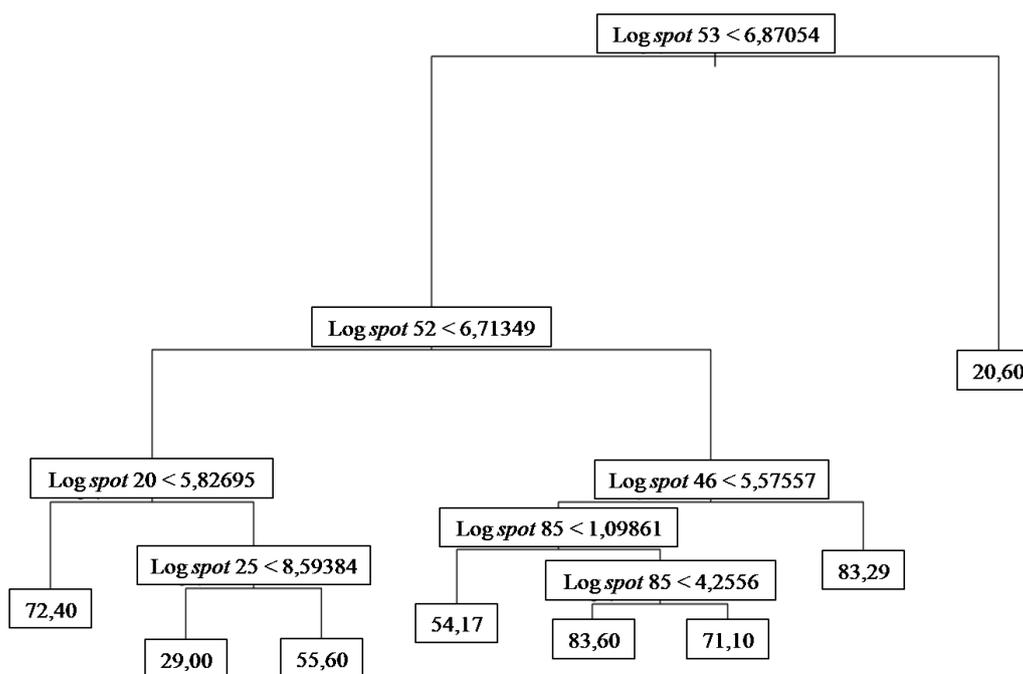


Figura 5. *Tree model* com as transformações Log mostrando as relações entre os 6 *spots* proteicos do plasma seminal (SPPs) e porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais aos 24 meses de idade (PEN24) em touros *Bos indicus* da raça Brahman. Os números dos *spots* mostrados na figura referem-se aos indicados na Figura 2A e Tabela 2. A importância da variável é indicada pelos ramos hierárquicos e, quanto mais distantes estes ramos, maiores as associações com as variáveis. Os valores no final dos ramos referem-se os valores médios de PNS24.

As análises utilizando o *Generalized Additive Model (GAM)* das proteínas do *Tree Model* mostraram uma relação não-linear entre os SPPs e a variável PEN24. Esta abordagem (*GAM*) confirmou os SPPs 85, 53, 52, 46, 25 e 20 quando transformados em Log (Figura 6), como tendo efeito significativo sobre a PEN24 ($p < 0.05$). O valor de R^2 correspondente foi de 65% nas transformações por Log e de 56% para as transformações por raiz quadrada.

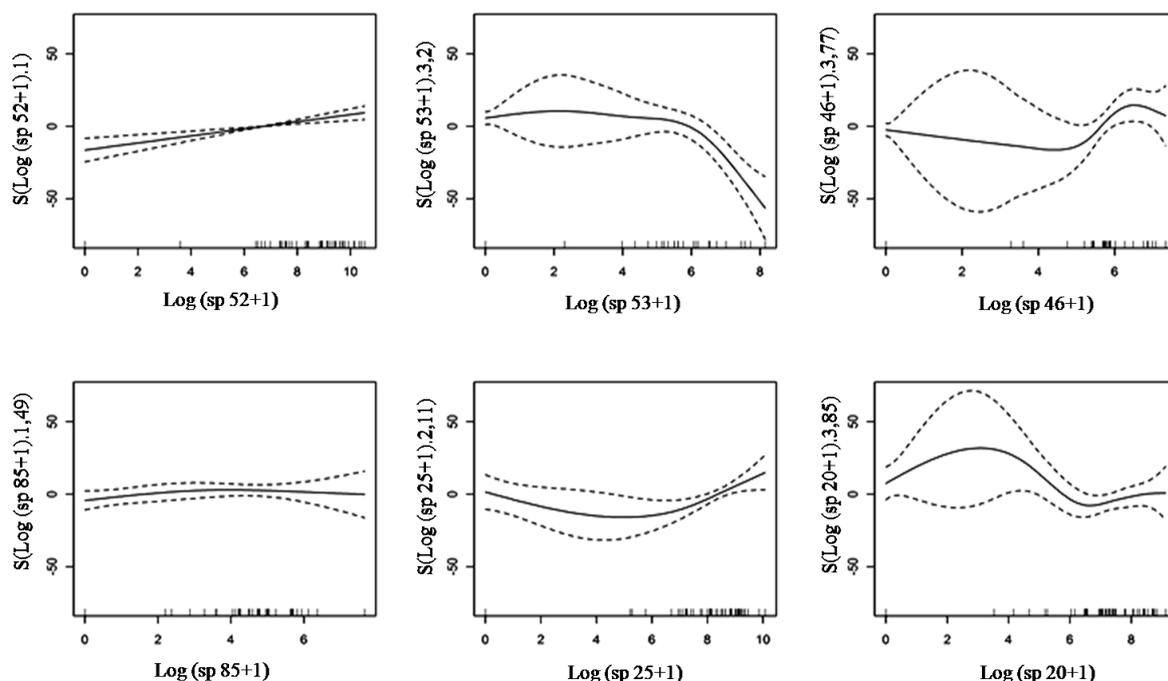


Figura 6. *Smoothers* não-paramétricos do modelo *GAM*, mostrando a relação entre a porcentagem de espermatozoides normais aos 24 meses (PEN24) e 6 *spots* proteicos do plasma seminal (transformação em Log) do *Tree models*. O eixo Y está em unidades lineares dimensionadas e o eixo X refere-se a valores das variáveis predictoras. A linha sólida é o valor previsto da PEN24 e as linhas tracejadas representam os intervalos de confiança de 95%.

Um modelo de seleção em *step-wise* mostrou que, com transformação logarítmica, os seis SPPs 85, 53, 52, 46, 25 e 20 podem ser usados para prever parte significativa do parâmetro PEN24 (Tabela 3). Entre estes, quatro dos SPPs 85, 52, 46 e 25 apresentaram associação positiva e dois outros, SPPs 53 e 20, associações negativas com a PEN24 (Tabela 3 e Figura 6). Juntos, estes SPPs explicaram 35% da variação fenotípica em PEN24 e 53%

quando os demais efeitos fixos, origem do reprodutor e data de nascimento, foram incluídos no modelo (Tabela 3). A identificação dos 6 spots descritos nos modelos de regressão (Tabela 3) foi confirmada através de espectrometria de massa, conforme lista da Tabela 4.

Tabela 3. *Spots* proteicos do plasma seminal (transformados por Log) e outros fatores identificados pelo modelo de regressão múltipla com *step-wise* e os seus efeitos sobre a porcentagem de espermatozoides normais em touros Brahman aos 24 meses de idade (PEN24). $R^2 = 0,53$, $p\text{-value} = 2.818e-05$. Os números dos *spots* referem-se àqueles descritos na Tabela 2.

Termos do Modelo	Estimativa	Padrão	Pr(> t)
(Intercepto)	-12760,00	3952,00	0,00232
Data do nascimento	0,35	0,11	0,00223
Origem* - Tartrus	-244,20	76,09	0,00245
Origem* - Weetalaba	-260,80	76,42	0,00137
log(sp85)	3,04	1,14	0,01049
log(sp53)	-1,91	0,87	0,03287
log(sp52)	1,76	0,72	0,01885
log(sp46)	1,26	0,98	0,20519
log(sp25)	0,03	0,98	0,97591
log(sp20)	-1,27	1,01	0,21538

* Origem: refere-se ao local de origem do touro.

DISCUSSÃO

A abordagem proteômica utilizada no presente estudo, com a combinação de eletroforese bidimensional, espectrometria de massa e ferramentas de bioinformática, permitiu a identificação das principais proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* grupamento genético altamente adaptado a ambientes tropicais e com reconhecida capacidade produtiva em sistemas de produção a pasto. Em função da análise dos parâmetros reprodutivos dos 56 touros incluídos neste estudo, considerados representativos para a raça Brahman do Nordeste da Austrália (FITZPATRICK et al., 2002; MCGOWAN et al., 2002), descreve-se também associações empíricas entre proteínas do plasma seminal e a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais aos 24 meses de idade destes touros. As atribuições das principais proteínas do fluido seminal dos animais *Bos indicus* são discutidas a seguir, dados os grupos funcionais aos quais pertencem e características bioquímicas.

Principais proteínas do plasma seminal

As proteínas mais abundantes no plasma seminal dos touros Brahman foram identificadas como *BSP1*, *3* e *BSP5*, semelhante ao que se descreve para o fluido seminal de touros *Bos taurus* (MANJUNATH et al., 1994; MOURA et al., 2007b) e em outras espécies como equinos (CALVETE et al., 1997), carneiros (SOUZA et al., 2012), caprinos (VILLEMURE et al., 2003) e bisões (BOISVERT et al., 2004). As *BSPs* apresentam na sua organização estrutural dois domínios de fibronectina tipo II (MANJUNATH et al., 2009), os quais lhes confere a capacidade de reconhecer e se ligar aos fosfolipídios presentes na membrana espermática após a ejaculação (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992), eventos que estimulam o efluxo de colesterol, permitem maior permeabilidade da membrana (MOREAU; MANJUNATH, 2000) e, contribuem, conseqüentemente, para o processo de

capacitação espermática. Em outro aspecto, as *BSPs*, além de atuar como chaperonas (SANKHALA; SWAMY, 2010), quando ligadas ao espermatozoide também mediam as interações destas células com o epitélio do oviduto, contribuindo assim para a formação do reservatório espermático neste órgão (GWATHMEY et al., 2006). Baseado na rede de interações proteína-proteína, as *BSPs* interagem com outras proteínas do plasma seminal descritas no presente estudo (*apolipoprotein A1*, *spermadhesin* e *epididymal secretory protein E1*), bem como com proteínas moduladoras da função espermática como a *zona pellucida binding protein*, *sperm adhesion molecule 1* e *sperm cation channel* (CATSPER3).

A *spermadhesin-1* e *spermadhesin Z13* constituem o segundo grupo de proteínas como maior expressão no plasma seminal dos touros Brahman. As *spermadhesins* já foram descritas como componente do plasma seminal de touros da raça holandesa (MOURA et al., 2006b), em varrões (SANZ et al., 1992), garanhões (TOPFER-PETERSEN et al., 2005), carneiros (BERGERON et al., 2005; SOUZA et al., 2012) e bodes (TEIXEIRA et al., 2006). *Spermadhesins* possuem a capacidade de interagir com fosfolipídios, carboidratos, inibidores de protease (SOLIS et al., 1998) e com glicoproteínas da zona pelúcida (SANZ et al., 1992). Utilizando a plataforma do STRING, determinou-se que as *spermadhesins* interagem potencialmente com a *BSP5*, *ecto-ADP-ribosyltransferase 5*, *phospholipase A2* e *osteopontin*, componentes proteicos estes identificados no presente estudo e que participam de eventos ligados à capacitação espermática, reação acrossômica e fertilização. Apesar destes atributos, estudos associaram negativamente a *spermadhesin Z13* presente no plasma seminal com a fertilidade de touros da raça holandesa (MOURA et al., 2006b), bem como a *spermadhesin 1* presente no epidídimo destes touros (WEMPE et al., 1992). Outros estudos ainda mostraram que as *spermadhesins* do fluido da cauda do epidídimo inibem a motilidade espermática, enquanto que as *spermadhesins* secretadas pelas vesículas seminais se ligam ao

espermatozoide após a ejaculação e inibem a motilidade espermática de forma reversível (DOSTALOVA et al., 1994).

Proteínas associadas com a maturação e proteção espermática

A *epididymal secretory protein E1* (ESP E1) foi identificada no plasma seminal dos touros *Bos indicus* e a isoforma detectada no *spot 20* (Figura 2) apresentou relação negativa com a porcentagem de espermatozoides normais dos touros Brahman. Esta proteína constitui também um dos componentes mais abundantes do fluido da cauda do epidídimo de touros da raça holandesa (MOURA et al., 2010) e, em humanos, sua função está ligada ao processo de maturação espermática (KIRCHHOFF et al., 1998). A ESP E1 presente no plasma seminal de carneiros interage com a superfície dos espermatozoides e está associada positivamente com a motilidade espermática e com a estrutura do espermatozoide durante a criopreservação (BERNARDINI et al., 2011). É possível que a relação negativa da ESP E1 com a PEN24 nos touros esteja relacionada com uma ineficiência no processo de maturação espermática. No entanto, mais estudos são necessários para entender como esta proteína pode influenciar na morfologia espermática. A *zinc-alpha-2-glycoprotein* (ZAG-2) é considerada uma proteína multifuncional e presente em diversos fluidos corporais como saliva, plasma seminal, leite e líquido amniótico (TADA et al., 1991; SANCHEZ et al., 1997). Durante o trânsito epididimário, a ZAG-2 liga-se ao espermatozoide e induz a fosforização de proteínas, ação responsável pelo início da motilidade destas células (DING et al., 2007; HASSAN et al., 2008). Apesar de a ZAG ter sido identificada como componente do plasma seminal de carneiros tropicalmente adaptados (SOUZA et al., 2012), este é o primeiro estudo a reportar a expressão desta proteína no plasma seminal de bovinos.

Diversas proteínas identificadas no plasma seminal dos touros Brahman atuam na proteção das células espermáticas, incluindo *lactotransferrin*, *glutathione peroxidase 3*, *hemoglobin subunit alpha*, *albumin*, *clusterin*, *heat shock 70 kDa protein 1A*, *platelet-*

activating factor acetylhydrolase, protein DJ-1 e fibrinogen. Durante o trânsito epididimário, os espermatozoides geram espécies reativas de oxigênio (EROs) as quais, quando em excesso, podem causar sérios danos ao DNA e membrana espermática (AGARWAL et al., 2005; ABBASIHORMOZI et al., 2012). Durante o metabolismo do ferro (Fe), ocorre a produção de radicais de peróxidos e, de forma concatenada, inicia-se a expressão de proteínas como a *transferrin* e *lactoferrin* como uma estratégia de debelar as EROs. Estas proteínas, juntamente com a *glutathione peroxidase 3* e *hemoglobin subunit alpha*, formam um verdadeiro “arsenal” capaz de proteger as células espermáticas contra as ações deletérias das EROs (DREVET, 2006; MOLLAN et al., 2012). Em estudos prévios, outros autores mostraram que níveis anormais de *transferrin* no plasma seminal foram associados à disfunção testicular e redução na fertilidade de humanos (HOLMES et al., 1982; ZALATA et al., 1996), resultados que evidenciam papéis importantes da *transferrin* para a fisiologia reprodutiva do macho. No presente estudo, as intensidades dos *spots* 52 e 46, identificados como *glutathione peroxidase 3*, apresentaram relação positiva com a percentagem de espermatozoides normais. Esta enzima tem sido descrita com elevada expressão em espermatozoides de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal (SHOJAEI SAADI et al., 2013) e, numa revisão recente, componentes da família das *glutathione peroxidases* contribuem para a integridade celular e potencial fecundante dos espermatozoides de mamíferos (CHABORY et al., 2010).

A *albumin* foi identificada em 17 isoformas nos géis bidimensionais do plasma seminal dos touros Brahman. Em *Bos taurus*, esta proteína constitui o componente mais abundante no fluido da cauda do epidídimo (MOURA et al., 2010), estando também presente no fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2007b). A expressão das isoformas da *albumin* no plasma seminal dos Brahman possui grande semelhança àquela encontrada no plasma seminal de carneiros tropicalmente adaptados (SOUZA et al., 2012),

fato que sugere um certo grau de similaridade entre as proteínas do fluido seminal de ruminantes em áreas tropicais. A *albumin* possui a capacidade de interagir com os peróxidos lipídicos, reduzindo os efeitos deletérios destas moléculas na membrana espermática (ALVAREZ; STOREY, 1995; ARMSTRONG et al., 1998). Esta proteína também constitui um receptor de “sterol” e pode estimular a capacitação espermática (GO; WOLF, 1985), reação acrossômica (SINGLETON; KILLIAN, 1983) e ainda participar de eventos ligados à fertilização (GONCALVES et al., 2008). Estes atributos multifuncionais da *albumin* conferem a esta proteína a habilidade de interagir com diversos componentes descritos no presente estudo, como a *apolipoprotein A-I*, *serpin peptidase inhibitor* e *transferrin*.

Chaperonas como a *clusterin* e a *heat shock protein 70 (HSP-70)* também são expressas no plasma seminal dos touros Brahman. A *clusterin* é secretada pelas células em resposta a ações de danos (SILKENSEN et al., 1994), estresse térmico (KIMURA et al., 1997) e age sinergicamente com a *HSP-70* (HUMPHREYS et al., 1999). Outra função da *clusterin* é conferir proteção às células contra a ação do sistema complemento (CHOI et al., 1989), regular o processo de morte celular (BUTTYAN et al., 1989), promover a agregação celular (SILKENSEN et al., 1995) e atuar na reabsorção de espermatozoides defeituosos no epidídimo (SYLVESTER et al., 1991). Uma isoforma monomérica da *clusterin* (aproximadamente 40 kDa), identificada no *spot 53* dos mapas 2-D do plasma seminal dos touros *Bos indicus*, apresentou associação negativa com a variável PEN24. Este *spot* também continha a proteína *APO-I*, porém com escore do íon muito maior para a *clusterin*. A função da *clusterin* no trato reprodutivo masculino pode variar dependendo da estrutura especial, de modificações pós-traducionais e do local de expressão (SENSIBAR et al., 1993). A insulação escrotal confere efeitos deletérios sobre a espermatogênese em carneiros, aumentando a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais e também as concentrações de *clusterin* nos testículos, sugerindo que esta proteína pode ser um indicador de inadequada

qualidade do sêmen (IBRAHIM et al., 2001b). Outros estudos destes autores também descreveram uma associação entre a *clusterin* e anormalidades morfológicas dos espermatozoides e uma menor motilidade espermática em touros (IBRAHIM et al., 2000; IBRAHIM et al., 2001a). Em humanos, foi demonstrado que a expressão da *clusterin* de 40 kDa foi maior no sêmen de homens inférteis em comparação com indivíduos férteis (ZALATA et al., 2012). Dessa forma, tem sido sugerido que a presença da isoforma de 40 kDa da *clusterin* no sêmen indica processos anormais da espermatogênese ou ainda uma inadequada maturação epididimária. A *HSP-70*, por sua vez, protege as células espermáticas contra o estresse térmico e/ou químico através da manutenção da homeostase celular (LINDQUIST; CRAIG, 1988). Estudos detectaram a *HSP-70* na superfície do espermatozoide de humanos (MILLER et al., 1992) e touros (KAMARUDDIN et al., 2004) e demonstraram também que há uma redistribuição desta proteína no espermatozoide durante a capacitação e reação acrossômica, fato que sugere uma ação desta proteína na interação entre gametas. Dessa forma, as chaperonas do plasma seminal podem constituir um sistema de suporte presente em determinados tipos de animais durante as reações dos mesmos a agentes causadores de estresse, como as temperaturas elevadas de regiões tropicais.

No presente trabalho, alguns *spots* foram identificados como *platelet-activating factor acetylhydrolase (PAFA)*, uma enzima que converte *platelet-activating factor (PAF)* em sua forma inativa, *lyso-PAF* (STAFFORINI et al., 1997). *PAFA* foi descrito como componente do plasma seminal de touros *Bos taurus*, garanhões e em coelhos (HOUGH; PARKS, 1994) e ambos, *PAFA* e *PAF* protegem os espermatozoides contra o estresse oxidativo e participam da estabilização da membrana espermática durante a criopreservação (YOSHIDA et al., 1992; JARVI et al., 1993). *PAF* está também positivamente associado com a motilidade espermática em humanos (ROUDEBUSH; PURNELL, 2000) e com a fertilidade em suínos (ROUDEBUSH; DIEHL, 2001). *Protein DJ-1* constitui uma proteína intracelular conservada

(NAGAKUBO et al., 1997) e tendo sido detectada nos testículos, epidídimos e espermatozoides de humanos (YOSHIDA et al., 2003), com funções similares à *glutathione peroxidase* (LEV et al., 2009; YU et al., 2013). Esta proteína é transcrita em resposta ao estresse oxidativo e atua eliminando os EROs através da sua própria oxidação, além de contribuir com a síntese de *glutathione* através do incremento da *glutamate cysteine ligase* (ZHOU; FREED, 2005). O presente estudo identificou relação positiva entre a *Protein DJ-1*, identificada no *spot* 46 dos mapas do plasma seminal (Figura 1), com a porcentagem de espermatozoides normais. Em concordância com esta relação empírica, a *Protein DJ-1* foi descrita como um marcador da fertilidade em ratos (KLINEFELTER, 2008) e, em humanos, apresenta reduzida expressão em pacientes com astenozoospermia, além de associação positiva com a motilidade espermática e com a atividade da *superoxide dismutase* no espermatozoide (AN et al., 2011).

O *fibrinogen* participa da coagulação sanguínea (LAKI, 1951), sendo que as duas cadeias ($A\alpha$ e $B\beta$) foram identificadas no presente estudo. *Fibrinogen A α* e *B β* foram encontrados no epidídimo de touros e a presença desta molécula no espermatozoide está associada a mecanismos de proteção da membrana contra proteólise ou como fatores antiaglutinação capazes de regular a capacitação (REYES-MORENO et al., 2002).

Outra importante linha de defesa presente no trato reprodutivo masculino está relacionada com as proteínas envolvidas na ativação do sistema imune e proteínas com propriedades antimicrobianas como a *cathelicidin-1*, *-3* e *-7*, *complement factor B* and *polymeric immunoglobulin receptor*, *ribonuclease-4*, *bovine seminal ribonuclease* e *angiogenin-1*. *Cathelicidins* constituem um dos grupos de proteínas com atividade antimicrobiana (ELSBACH; WEISS, 1992; BALS; WILSON, 2003) e são expressas no epidídimo e plasma seminal de humanos (MALM et al., 2000). As *cathelicidins* interagem com lipoproteínas formando um reservatório de componentes microbianos (TJABRINGA et

al., 2005) com intuito de proteger os espermatozoides dos efeitos tóxicos da degradação proteica (MALM et al., 2000). Apesar das *cathelicidin 1* terem sido descritas como parte da superfície espermática de touros *Bos taurus* (BYRNE et al., 2012), o presente estudo é o primeiro a identificar as *cathelicidin 1, 3 e 7* como componentes do plasma seminal de bovinos.

Proteínas do sistema complemento regulam diversos aspectos da resposta imune (BRADLEY et al., 2011). O *complement factor B*, membro desta família, é sintetizado pelo fígado e encontrado na corrente sanguínea como precursor inativo (DAVRINCHE et al., 1990). Quando estimuladas, proteases clivam proteínas específicas induzindo ampliações em massa e a ativação do complexo de ataque da membrana durante processo de morte celular (BENZAQUEN et al., 1994; BRADLEY et al., 2011). O mecanismo de regulação da ação do *complement factor B* no plasma seminal provavelmente efetiva-se através de inibidores também presentes no fluido seminal (PETERSEN et al., 1980). De fato, o inibidor deste *complement* é uma protease que atua de forma isolada em combinação com outras proteínas para conferir ao espermatozoide proteção contra reações do sistema complemento (PETERSEN et al., 1980). O *polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)* constitui uma proteína transmembrana produzida por células epiteliais e é um precursor da forma secretada da proteína *immunoglobulin A* (BRANDTZAEG; PRYDZ, 1984; MOSTOV et al., 1984). A *Immunoglobulin A*, por sua vez, representa uma das primeiras linhas de defesa antígeno-específico contra patógenos de mucosas (KAETZEL, 2013) e, em humanos, o *pIgR* é expresso na próstata e glândula uretral, e media a translocação das imunoglobulinas no trato genital masculino (SIRIGU et al., 1995; CUNNINGHAM et al., 2008). O *pIgR* foi detectado no presente estudo e representa uma nova proteína do plasma seminal de bovinos, potencialmente agindo como um fator adicional para manter a integridade do trato reprodutivo contra agentes infecciosos. *Bovine seminal ribonuclease (BS-RNase)* e

ribonuclease-4 são membros da superfamília das ribonucleases produzida pela ampola e vesículas seminais e estão presentes no plasma seminal de touros *Bos taurus* (MATOUSEK; KLAUDY, 1998). *BS-RNase* liga-se aos espermatozoides após a ejaculação (SHIVAJI et al., 1989) e age como um imunossupressor, viabilizando a proteção do espermatozoide contra o sistema imune da fêmea (QUAYLE; JAMES, 1990). Como uma enzima do metabolismo do ácido nucléico, *BS-RNase* pode agir atacando o RNA gerado durante os estímulos mitogênicos ou antigênicos da proliferação celular (MATOUSEK; KLAUDY, 1998). A *angiogenin* é um fator angiogênico presente no fluido folicular humano (KOGA et al., 2000) e no endométrio (KOGA et al., 2001), bem como no plasma seminal de touros *Bos taurus* (KELLY et al., 2006). A *angiogenin* é também encontrada nos testículos de humanos e age durante a espermatogênese no transporte espermático (KOGA et al., 2004). A *angiogenin 1* do rato possui atividade antibiótica (bactericida e fungicida) indicando possivelmente uma função ligada à proteção celular (HOOPER et al., 2003).

Proteínas envolvidas na regulação da proteólise e glicólise

Diversas proteases e inibidores de proteases foram identificados no plasma seminal dos touros Brahman, incluindo *cathepsins L1 and -S*, *tripeptidyl-peptidase 1*, *proteasome subunit beta type-4*, *TIMP-2*, *plasma serine protease inhibitor*, *serpin A3-7* e *macroglobulins*. As *cathepsins* participam da degradação proteica e na ativação de precursores enzimáticos (Barrett, 1981) e a *cathepsin S hydrolysis* é em parte similar à *cathepsin L1* (RITONJA et al., 1991), cuja ação influencia a transformação da membrana espermática durante o trânsito epididimário (DACHEUX et al., 2003). Estudos prévios demonstraram que há uma maior expressão das *cathepsins* no fluido da cauda do epidídimo de touros da raça holandesa de alta fertilidade (MOURA et al., 2006a). Provavelmente, as *cathepsins* modificam as proteínas de membrana (RACZEK et al., 1995) e assim, a capacidade fertilizante do espermatozoide. O

proteasome subunit beta type-4 faz parte de um complexo de proteinases multicatalítico identificado nos espermatozoides de touros *Bos taurus* (D'AMOURS et al., 2010) e carneiros (SOUZA et al., 2012). A principal função deste complexo está relacionada com a degradação de “proteínas marcadas” (*ubiquitin-labeled proteins*) (SUTOVSKY et al., 2004; DAVALIEVA et al., 2012). *Proteassomes* estão presentes no acrossoma de espermatozoides de humanos e atuam na degradação proteica durante a capacitação (MORALES et al., 2003). Em humanos, *proteassomes* também participam do desacoplamento da cauda espermática e no desenvolvimento pronuclear após a fertilização (RAWE et al., 2008). Em suínos, inibidores de *proteasome* e anticorpos anti*proteasoma* bloqueiam a penetração na zona pelúcida sem afetar a motilidade espermática e exocitose do acrossoma (SUTOVSKY et al., 2004). Sugere-se, portanto, que o *proteasome subunit beta type-4*, aqui descrito pela primeira vez como componente do plasma seminal de bovinos, possa desempenhar funções relacionadas a capacitação espermática e mediar a interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida.

Metalloproteinase inhibitor 2 modula uma série de gelatinases presentes no plasma seminal e tem sido descrita como um componente do fluido da cauda do epidídimo (METAYER et al., 2002) e glândulas sexuais acessórias de animais *Bos taurus* (MOURA et al., 2007b), bem como no plasma seminal de touros Nelore (ASSUMPCAO et al., 2005). Espermatozoides associados à *TIMP-2* são mais férteis quando comparados com espermatozoides sem *TIMP-2* (MCCAULEY et al., 2001) e tem sido sugerido que esta proteína participa durante a interação entre gametas (CORREA et al., 2000). O presente estudo descreve uma associação negativa entre a expressão da *TIMP-2* no plasma seminal (identificada no *spot 20*) e a porcentagem de espermatozoides normais. Os estudos anteriores, citados acima, identificaram associações positivas entre e *TIMP-2* nas células espermáticas e a fertilidades dos touros, diferentemente do resultado descrito no presente estudo, onde a

relação com o parâmetro seminal foi detectada com a proteína do plasma seminal. As análises de interação proteína-proteína mostram que a *TIMP-2* possui uma interface de ligação com endopeptidases e outras *matriz metalloproteinases* compondo um sistema de controle da ação destas proteinases no plasma seminal dos touros e é, possível, portanto, que o equilíbrio entre as ações destes componentes seja determinante para a integridade das células espermáticas.

Plasma serine protease inhibitor e *serpin A3-7* também foram identificadas no plasma seminal dos touros Brahman e possuem o papel de inativar as *serino proteases* e inibir outras duas proteínas como a *serpin* e *acrosin* (YUASA et al., 2000). Tem sido especulado que *serpins* inibem a atividade da calicreína e podem influenciar a motilidade espermática e fertilização (SUZUKI et al., 1990). A *alpha 2-macroglobulin* é um inibidor de protease (Sottrupjensen, 1989), também detectado no plasma seminal de carneiros (SOUZA et al., 2012), e parece agir no epidídimo de ovinos possivelmente modulando a atividade de outras proteases (PELOILLE et al., 1997b). A *beta 2-microglobulin* é encontrada na região pós-acrossomal dos espermatozoides do homem (FELLOUS et al., 1976) e sua expressão no plasma seminal está associada com a produção de espermatozoides (CHARD et al., 1991).

Alpha-enolase, *prostaglandin-H2 D-isomerase* e *phosphoglycerate kinase 1* foram identificadas no plasma seminal dos touros Brahman. A *alpha-enolase* constitui uma enzima glicolítica presente no fluido epididimário de touros *Bos taurus* (MOURA et al., 2010) e vesículas seminais de carneiros (SOUZA et al., 2012). Esta enzima hidrolisa açúcares presentes na membrana espermática durante o processo de maturação (TULSIANI et al., 1998) e está envolvida na interação entre gametas (ABASCAL et al., 1998). *Prostaglandin-H2 D-isomerase* é uma *glutathione independent prostaglandin synthase* que catalisa a conversão da *prostaglandin H2* em *prostaglandin D2* (URADE et al., 1995). *Prostaglandin D2 synthase (PGDS)* é uma proteína epididimária em carneiros (SOUZA et al., 2012), cavalos (FOUCHECOURT et al., 1999) e touros (BELLEANNEE et al., 2011). A expressão

da *PGDS* no plasma seminal foi positivamente correlacionada com a fertilidade dos touros (KILLIAN et al., 1993; GERENA et al., 1998). *Phosphoglycerate kinase* é uma enzima intracelular que catalisa a transferência do grupo fosfato da *1,3-bisphosphoglycerate* para *ADP* produzindo *3-phosphoglycerate* e *ATP* (DANSHINA et al., 2010). A via glicolítica é a principal rota para produção de *ATP* no espermatozoide (EDDY et al., 2003), estando a *phosphoglycerate kinase* presente no espermatozoide de humanos (UTLEG et al., 2003) e plasma seminal de touros *Bos taurus* (KELLY et al., 2006). Segundo os modelos estatísticos empregados no presente estudo, a *phosphoglycerate kinase 1*, identificada no *spot* 85, foi associada positivamente com a porcentagem de espermatozoides normais no sêmen de touros *Bos indicus*. Em estudo recente, a *phosphoglycerate kinase* foi associada com a normalidade da histologia do testículo, com a contagem de espermatozoides e com o metabolismo de espermatozoides de ratos (DANSHINA et al., 2010) demonstrando a importância desta enzima na manutenção da função espermática.

Proteínas envolvidas na capacitação espermática e reação acrossômica

Há evidência de que, além das *BSPs* e *albumin*, outros componentes do fluido seminal de touros *Bos indicus* desempenham funções ligadas à capacitação espermática e reação acrossômica, como a *apolipoprotein A1 (Apo-A1)*, *actin* e *protein S100-A9*. *Apo-A1* é uma lipoproteína de alta densidade (RADER, 2006) e também secretada no epidídimo de touros *Bos taurus* (MOURA et al., 2010; BELLEANNEE et al., 2011) e carneiros (SOUZA et al., 2012). Após a ejaculação, *Apo-A1* interage com o colesterol e fosfolipídios espermáticos (JHA et al., 2008) induzindo a fosforização proteica, como parte dos eventos ligados à capacitação espermática (MANJUNATH et al., 1989). Em estudo recente, foi demonstrado que espermatozoides de ratos adquirem a *Apo-A1* na região apical da membrana acrossômica durante o processo de maturação espermática (IJIRI et al., 2011). No presente estudo a *Apo-*

A1 foi identificada no *spot* 52 (32,2 kDa; pI 4,6) e *spot* 25 (10,7 kDa; pI 9,2), ambos associados positivamente com a porcentagem de espermatozoides normais. O *spot* 53, negativamente associado com PEN24, também foi identificado como sendo uma *Apo-A1*, porém esta isoforma apresentou valores de kDa e pI distintos (41,3 kDa; 4,7 pI) daqueles associados aos spots 52 e 25. A eletroforese 2-D com faixas de pH mais extensas como a utilizada no presente estudo (3-11) causa, em alguns casos, sobreposição de *spots*, fato que contribui para a identificação de mais de uma proteína no mesmo *spot*. A *actin* foi detectada no plasma seminal dos touros Brahman mais provavelmente como um resultado de lise celular. A *actin* tem sido descrita também no plasma seminal de carneiros (SOUZA et al., 2012) e fluido da cauda do epidídimo em touros *Bos taurus* (MOURA et al., 2010). Especificamente em espermatozoides humanos, a *actin* é encontrada no acrossoma, região pós-acrossoma e cauda (OCHS; WOLF, 1985; FOUQUET; KANN, 1992), sugerindo o seu envolvimento durante a reação acrossômica (BREITBART et al., 2005). A *protein S100-A9* está localizada no citoplasma e/ou no núcleo de um grande número de células, incluindo o espermatozoide (DE MATEO et al., 2011). A função específica da *protein S100-A9* na reprodução do macho ainda não está clara, porém este componente do plasma seminal pode estar envolvido na regulação de processos celulares (KERKHOFF et al., 1998) e resistência à invasão de patógenos (MURTHY et al., 1993). A *protein S100-A9* citoplasmática também induz a translocação de componentes do citoesqueleto para a membrana plasmática, elevando as concentrações de cálcio e potencialmente participando na hiperativação e capacitação espermática (ROTH et al., 1993). O presente estudo é o primeiro a descrever a *protein S100-A9* como componente do plasma seminal de bovinos.

A *secretoglobin 1D*, também conhecida como *lipophilin-A*, constitui um membro da família da *uteroglobin* e foi identificada no *spot* 25, juntamente com a proteína *Apo-I*, apresentando relação positiva com a porcentagem de espermatozoides normais nos ejaculados

dos touros Brahman. As proteínas da família *uteroglobin* foram inicialmente detectadas no útero de coelhos e subsequentemente nas secreções da vesícula (NOSKE; GOODING, 1978) e plasma seminal (BEIER et al., 1975). Em humanos, a *uteroglobin* proveniente do fluido das glândulas sexuais acessórias liga-se ao espermatozoide no momento da ejaculação atuando como fator decapacitante e com um efeito negativo sobre a motilidade espermática (LUCONI et al., 2000). Em humanos, a *secretoglobin (SCGB) 2A1* é expressa na próstata e forma heterodímeros com *secretoglobin D1* (XIAO et al., 2005). O papel do *secretoglobin 1D* na função reprodutiva masculina e seus efeitos sobre a morfologia espermática em touros ou mesmo em outras espécies é desconhecido e ainda precisa ser investigado.

Proteínas associadas com a interação entre gametas

Proteínas associadas com adesão celular foram identificadas no plasma seminal dos touros Brahman, incluindo a *osteopontin-K (OPN)*, *nucleobinding-1*, *cadherin-1*, *ephrin-A1* e *annexinA1*. A *OPN* foi primeiramente isolada da matriz óssea de bovinos (FRANZEN; HEINEGARD, 1985) e mais tarde detectada na glândula mamária, oviduto, útero, ovário e testículos (LUEDTKE et al., 2002), com funções gerais associadas a adesão celular e remodelamento de membrana (DENHARDT, 2004). A quantidade de *OPN* no sêmen (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997) e no fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2006a) está relacionada com a fertilidade de touros da raça holandesa avaliada *in vivo* e *in vitro*. A hipótese que explica esta associação baseia-se na capacidade da *OPN* mediar a interação espermatozoide-oócito (MOURA, 2005). Em suporte a esta afirmativa, estudos tem evidenciado que a *OPN*, quando adicionada ao meio de fertilização *in vitro* ou ao diluidor do sêmen, induz incrementos na taxa de fertilização e de desenvolvimento embrionário em bovinos (GONCALVES et al., 2008; MONACO et al.,

2009) e suínos (HAO et al., 2008) *in vitro*. O presente estudo é o primeiro a descrever a *osteopontin* no plasma seminal de touros *Bos indicus*.

Nucleobinding-1 foi primeiramente descrita no trato reprodutivo masculino por Moura e co-autores, como componente do fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2007b) e da cauda do epidídimo (MOURA et al., 2010). As *nucleobinding* ligam-se ao cálcio e participam de sinalizações intracelulares, interação célula-célula e apoptose (VALENCIA et al., 2008; KONCZOL et al., 2010). Dado a estes atributos e habilidade de se associar com a matriz extracelular (PETERSSON et al., 2004), sugere-se presentemente que as *nucleobinding* podem interagir com proteínas espermáticas modulando a fertilização. Outra proteína potencialmente envolvida na interação entre gametas é a *cadherin-1*, a qual pertence à família das moléculas de adesão cálcio-dependentes (ANGST et al., 2001). A *cadherin* está presente no epidídimo (DUBE et al., 2007), plasma seminal (DE PAUL et al., 2005) e espermatozoide de humanos (PUROHIT et al., 2004) e, de forma semelhante, participa na interação entre gametas e no desenvolvimento embrionário (MARRS; NELSON, 1996; ANGST et al., 2001). Tanto as *integrins* quanto as *cadherins* estão expressas nos gametas de mamíferos (EVANS, 2002; ZIV et al., 2002), fato que sugere a existência de funções deste complexo *cadherin-integrin* na adesão celular durante a fertilização (MARIN-BRIGGILER et al., 2008). *Ephrins* e *ephrin receptor* constituem proteínas da superfície celular (COULTHARD et al., 2012) sendo este o primeiro estudo a reportar tais componentes no plasma seminal de bovinos. Em conjunto, *ephrin B*, *ephrin-A1* são conhecidas como o sistema *Eph-Ephrin* presente na superfície de várias células. Durante a implantação embrionária em suínos (FU et al., 2012) e na placentação em humanos (FUJIWARA et al., 2002), *Eph-Ephrins* geram sinais para a iniciação da invasão do citotrofoblasto e, conseqüentemente, a interação com o útero (RED-HORSE et al., 2005). Estudos demonstraram que a *ephrin-A1* age durante as fases agudas das inflamações (IVANOV;

ROMANOVSKY, 2006; COULTHARD et al., 2012) porém, a função desta proteína na fisiologia reprodutiva do macho ainda não está clara.

A *annexin A1* foi identificada em três *spots* nos géis bidimensionais do plasma seminal dos touros *Bos indicus*, molécula que pertence à família das *Ca²⁺-regulated e membrane-binding proteins* – proteínas de membrana e reguladas por cálcio (RESCHER; GERKE, 2004). A *annexin 5* é a proteína mais abundante no plasma seminal de coelhos (ARRUDA-ALENCAR, 2012) e, em humanos, *annexin A1* é secretada pela próstata (CHRISTMAS et al., 1991). Em bovinos, anticorpos contra *annexins* bloquearam a ligação entre o espermatozoide e o epitélio do oviduto (IGNOTZ et al., 2007) e, semelhante às *BSPs*, as *annexins* do plasma seminal apresentam alta afinidade por fatores capacitantes como a heparina e glicosaminoglicanos (ISHITSUKA et al., 1998; SHAO et al., 2006). Tais características sugerem que as *annexins* participam do processo de capacitação espermática, assim como as *BSPs*, mas avaliações experimentais ainda são necessárias para a comprovação desta hipótese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, descreve-se, no presente trabalho, o proteoma do plasma seminal de touros *Bos indicus*. De forma inédita, o estudo foi baseado em amostras de sêmen de 56 animais com “*status*” reprodutivo conhecidamente representativo dos rebanhos de animais Brahman criados no ambiente tropical do Nordeste da Austrália. A ontologia gênica confirmou a diversidade funcional das proteínas do plasma seminal, com principais funções relacionadas à ligação e atividade catalítica. Em função de estudos prévios e da literatura, sugere-se ainda que as proteínas seminais do *Bos indicus* atuem durante a maturação espermática, proteção, capacitação, sobrevivência do espermatozoide no oviduto, reação acrossômica e fertilização.

O presente estudo também indica que a expressão de proteínas seminais está associada à morfologia espermática dos animais aos 24 meses de idade, variável correlacionada com a fertilidade de touros em rebanhos da raça Brahman. Após confirmação através de duas análises independentes com espectrometria de massa, proteínas relacionadas positivamente com a variável PEN24 foram identificadas como *apolipoprotein A-I*, *glutathione peroxidase 3*, *protein DJ-1*, *phosphoglycerate kinase 1* e *secretoglobin family 1D member*. Estes componentes do fluido seminal possuem funções potencialmente associadas com a maturação e capacitação, proteção contra processos oxidativos e geração de ATP nas células espermáticas. Spots cujas intensidades apresentaram relação negativa com a PEN24 foram identificados como *clusterin*, *apolipoprotein A-I*, *epididymal secretory protein E1* e *metalloproteinase inhibitor 2 precursor*, proteínas estas que potencialmente atuam em resposta a danos, estresse térmico, ação do sistema imunológico e processo de apoptose, no caso da *clusterin*, maturação (*ESP E1*) e controle de ação de proteases do sêmen (*TIMP-2*). Proteínas relacionadas significativamente com a variável PEN24 podem servir de marcadores moleculares durante processos de avaliação da fertilidade potencial dos reprodutores.

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, I. et al. Alteration of the isoform composition of plasma-membrane-associated rat sperm alpha-L-fucosidase during late epididymal maturation: comparative characterization of the acidic and neutral isoforms. **Biochemical Journal**, v. 333, p. 201-207, Jul 1 1998.
- ABBASIHORMOZI, S. et al. Relationship of leptin administration with production of reactive oxygen species, sperm DNA fragmentation, sperm parameters and hormone profile in the adult rat. **Archives of gynecology and obstetrics**, Dec 27 2012.
- ACHILLI, A. et al. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. **Current biology : CB**, v. 18, n. 4, p. R157-8, Feb 26 2008.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 654-660, Nov-Dec 2005.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty-acids into and peroxidative loss of fatty-acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 3, p. 334-346, Nov 1995.
- ALVES TEIXEIRA, D. I. et al. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 79-87, 2006 2006.

AN, C.-N. et al. Down-regulation of DJ-1 protein in the ejaculated spermatozoa from Chinese asthenozoospermia patients. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 19-23.e2, 2011.

ANGST, B. D.; MARCOZZI, C.; MAGEE, A. I. The cadherin superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. Pt 4, p. 625-6, Feb 2001.

ARMSTRONG, J. S. et al. Antioxidant potential of human serum albumin: Role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 4, p. 412-419, Jul-Aug 1998.

ARRUDA-ALENCAR, J. M., VIANA NETO, A. M. V., SOUZA, C. E. A., MARTINS, J. A. M., MORENO, F. B., MOREIRA, A. C. O., GUERREIRO, M.E.F, MOURA, A. A. N. A. Major proteins of the seminal plasma of new zeland white rabbits and association with semen criteria. **In: 10th World Rabbit Congress**, 2012, Sharm el Sheik - Egitoo 2012.

ASSUMPCAO, T. I. et al. Proteome analysis of Nelore bull (*Bos taurus indicus*) seminal plasma. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 8, p. 813-7, Nov 2005. ISSN 0929-8665 (Print) 0929-8665 (Linking).

BALS, R.; WILSON, J. M. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 4, p. 711-20, Apr 2003.

BARRETT, A. J. Cystatin, the egg-white inhibitor of cysteine proteinases. **Methods in Enzymology**, v. 80, p. 771-778, 1981 1981. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1981NF95400057 >.

BEIER, H. M.; BOHN, H.; MULLER, W. Uteroglobin-like antigen in male genital-tract secretions. **Cell and Tissue Research**, v. 165, n. 1, p. 1-11, 1975.

BELLEANNÉE, C. et al. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 59-78, Jan 1 2011.

BENZAQUEN, L. R.; NICHOLSON-WELLER, A.; HALPERIN, J. A. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. **J Exp Med**, v. 179, n. 3, p. 985-92, Mar 1 1994.

BERGERON, A. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 4, p. 461-70, Aug 2005.

BERNARDINI, A. et al. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 436-447, 2011.

BHATIA, V. N. et al. Software Tool for Researching Annotations of Proteins: Open-Source Protein Annotation Software with Data Visualization. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 23, p. 9819-9823, Dec 1 2009.

BOISVERT, M. et al. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 3, p. 656-661, Mar 2004.

BORTOLUSSI, G. et al. The northern Australian beef industry, a snapshot. 2. Breeding herd performance and management. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, n. 9, p. 1075-1091, 2005.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976.

BRADLEY, D. T.; ZIPFEL, P. F.; HUGHES, A. E. Complement in age-related macular degeneration: a focus on function. **Eye (London, England)**, v. 25, n. 6, p. 683-93, Jun 2011.

BRANDTZAEG, P.; PRYDZ, H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. **Nature**, v. 311, n. 5981, p. 71-3, Sep 6-11 1984.

BREIMAN, L. et al. Classification and Regression Trees. **Belmont, California, USA, Wadsworth, Inc.**, 1984.

BREITBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 129, n. 3, p. 263-8, Mar 2005.

BURNS, B. M. et al. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 1. Experimental design and animal measures. **Animal Production Science**, v. 53, n. 2, p. 87-100, 2013 2013.

BUTTYAN, R. et al. Induction of the trpm-2 gene in cells undergoing programmed death. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 8, p. 3473-3481, Aug 1989.

BYRNE, K. et al. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **Proteomics**, v. 12, n. 23-24, p. 3559-79, Dec 2012.

CALVETE, J. J. et al. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **Febs Letters**, v. 407, n. 2, p. 201-206, Apr 28 1997.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, Dec 1997.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, May 2004.

CHABORY, E. et al. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 4, p. 1321-31, Apr 2010.

CHARD, T. et al. The concentrations of transferrin, beta-2-microglobulin, and albumin in seminal plasma in relation to sperm count. **Fertility and Sterility**, v. 55, n. 1, p. 211-213, Jan 1991.

CHOI, N. H.; MAZDA, T.; TOMITA, M. A serum-protein sp40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes. **Molecular Immunology**, v. 26, n. 9, p. 835-840, Sep 1989.

CHRISTMAS, P. et al. Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. **J Biol Chem**, v. 266, n. 4, p. 2499-507, Feb 5 1991.

CORBET, N. J. et al. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. **Animal Production Science**, v. 53, n. 2, p. 101-113, 2013 2013.

CORREA, L. M. et al. A role for a TIMP-3-sensitive, Zn²⁺-dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion. **Developmental Biology**, v. 225, n. 1, p. 124-134, Sep 1 2000.

COULTHARD, M. G. et al. Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. **The American journal of pathology**, v. 181, n. 5, p. 1493-503, Nov 2012.

CUNNINGHAM, K. A. et al. Poly-immunoglobulin receptor-mediated transport of IgA into the male genital tract is important for clearance of Chlamydia muridarum infection. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 60, n. 5, p. 405-14, Nov 2008.

D'AMOURS, O. et al. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 3, p. 545-56, Mar 2010.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, May 1 2003.

DANSHINA, P. V. et al. Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 1, p. 136-145, Jan 2010.

DAVALIEVA, K. et al. Proteomic analysis of seminal plasma in men with different spermatogenic impairment. **Andrologia**, v. 44, n. 4, p. 256-64, Aug 2012.

- DAVRINCHE, C.; ABBAL, M.; CLERC, A. Molecular characterization of human complement factor B subtypes. **Immunogenetics**, v. 32, n. 5, p. 309-12, 1990.
- DE MATEO, S. et al. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. **Proteomics**, v. 11, n. 13, p. 2714-26, Jul 2011.
- DE PAUL, A. L. et al. Soluble p-cadherin found in human semen. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 44-7, Jan-Feb 2005.
- DENHARDT, D. T. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, May 10-12, 2002. **Calcified Tissue International**, v. 74, n. 3, p. 213-219, March 2004.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, May 15 1992.
- DING, Z. et al. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 9, p. 1124-1131, Sep 2007.
- DOSTALOVA, Z. et al. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, n. 7, p. 457-61, Jul 1994.
- DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 70-79, May 16 2006.
- DRUART, X. et al. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of proteomics**, v. 91C, p. 13-22, Jun 6 2013.
- DUBE, E. et al. Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 6, p. 1034-44, Jun 2007.
- EDDY, E. M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D. A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 103-15, May 1 2003.
- ELSBACH, P.; WEISS, J. **Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes**. 1992.
- EVANS, J. P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. **Human reproduction update**, v. 8, n. 4, p. 297-311, Jul-Aug 2002.
- FELLOUS, M.; COLLE, A.; TONNELLE, C. Expression of human beta2-microglobulin on human spermatozoa. **European Journal of Immunology**, v. 6, n. 1, p. 21-24, 1976 1976.
- FINK, E. et al. Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma Angiotensin converting enzyme in human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 247B, n. 1, p. 311-5, Feb 1989.
- FITZPATRICK, L. A. et al. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 39-49, May 15 2002.
- FORDYCE, G. et al. Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1140-1148, Sep 15 2006.
- FOUCHECOURT, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. Glutathione-independent prostaglandin D-2 synthase in ram and stallion epididymal fluids: Origin and regulation. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 3, p. 558-566, Mar 1999.
- FOUQUET, J. P.; KANN, M. L. Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa - fact or artifact. **Microscopy Research and Technique**, v. 20, n. 3, p. 251-258, Feb 1 1992.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of 2 sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, n. 3, p. 715-724, 1985 1985.

FU, Y. et al. Expression of Eph A molecules during swine embryo implantation. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 3, p. 2179-85, Mar 2012.

FUJIWARA, H. et al. Human endometrial epithelial cells express ephrin A1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 87, n. 12, p. 5801-7, Dec 2002.

GERENA, R. L. et al. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 3, p. 826-833, Mar 1998.

GO, K. J.; WOLF, D. P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. **Biology of reproduction**, v. 32, n. 1, p. 145-153, 1985 1985.

GONCALVES, R. F.; STAROS, A. L.; KILLIAN, G. J. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43, n. 6, p. 720-9, Dec 2008.

GONCALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alphaV and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 468-74, Feb 2007.

GWATHMEY, T. M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-7, Oct 2006.

HAO, Y. et al. Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 2, p. 291-8, Feb 2008.

HASSAN, M. I. et al. Zinc alpha 2-glycoprotein: A multidisciplinary protein. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 892-906, Jun 2008.

HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R. Generalized Additive Models. **Chapman & Hall/CRC**1990.

HOLMES, S. D.; LIPSHULTZ, L. I.; SMITH, R. G. Transferrin and gonadal dysfunction in man. **Fertility and Sterility**, v. 38, n. 5, p. 600-604, 1982 1982.

HOLROYD, R. G. et al. Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 67-79, May 15 2002.

HOOPER, L. V. et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. **Nature immunology**, v. 4, n. 3, p. 269-73, Mar 2003.

HOUGH, S. R.; PARKS, J. E. Platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 4, p. 912-916, Apr 1994.

HUMPHREYS, D. T. et al. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 6875-6881, Mar 12 1999.

IBRAHIM, N. M.; FOSTER, D. N.; CRABO, B. G. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 891-902, Sep-Oct 2001.

IBRAHIM, N. M. et al. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 887-94, Nov-Dec 2000.

IBRAHIM, N. M. et al. Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 863-77, Sep-Oct 2001.

IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 906-13, Dec 2007.

IJIRI, T. W. et al. Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation. **Proteomics**, v. 11, n. 20, p. 4047-4062, 2011.

ISHITSUKA, R. et al. Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, and VI. **J Biol Chem**, v. 273, n. 16, p. 9935-41, Apr 17 1998.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. **IUBMB life**, v. 58, n. 7, p. 389-94, Jul 2006.

JARVI, K. et al. Platelet-activating-factor acetylhydrolase in the male reproductive-tract - origin and properties. **International journal of andrology**, v. 16, n. 2, p. 121-127, Apr 1993.

JHA, K. N. et al. Biochemical and structural characterization of apolipoprotein A-I binding protein, a novel phosphoprotein with a potential role in sperm capacitation. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2108-2120, May 2008.

JOBIM, M. I. 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. 255-66, Jan 15 2004.

JOHNSTON, D. J. et al. Genetics of heifer puberty in two tropical beef genotypes in northern Australia and associations with heifer- and steer-production traits. **Animal Production Science**, v. 49, n. 5-6, p. 399-412, 2009 2009.

KAETZEL, C. S. **The Polymeric Immunoglobulin Receptor**. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2013.
KAMARUDDIN, M. et al. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 36, n. 5, p. 327-34, Oct 2004.

KAPPLER, U.; NOUWENS, A. S. The molybdoproteome of *Starkeya novella*--insights into the diversity and functions of molybdenum containing proteins in response to changing growth conditions. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 4, p. 325-34, Apr 2013.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43 Suppl 2, p. 368-73, Jul 2008.

KELLY, V. C. et al. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5826-33, Nov 2006.

KERKHOFF, C.; KLEMP, M.; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1448, n. 2, p. 200-11, Dec 10 1998.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, Dec 1993.

KIMURA, K.; ASAMI, K.; YAMAMOTO, M. Effect of heat shock treatment on the production of variant testosterone-repressed prostate message-2 (TRPM-2) mRNA in culture cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 15, n. 4, p. 251-257, Dec 1997.

KIRCHHOFF, C. et al. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. **Andrologia**, v. 30, n. 4-5, p. 225-232, Aug-Sep 1998.

KLINEFELTER, G. R. Saga of a sperm fertility biomarker. **Anim Reprod Sci**, v. 105, n. 1-2, p. 90-103, Apr 2008.

KOGA, K. et al. Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3352-5, Sep 2000.

KOGA, K. et al. Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5609-14, Nov 2001.

KOGA, K. et al. Evidence for the presence of angiogenin in human testis. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 369-74, May-Jun 2004.

KONCZOL, K. et al. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. **Neurochemistry international**, v. 57, n. 3, p. 189-97, Oct 2010.

KRAUS, M. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of reproductive immunology**, v. 65, n. 1, p. 33-46, Feb 2005.

LAKI, K. The action of thrombin on fibrinogen. **Science (New York, N.Y.)**, v. 114, n. 2965, p. 435-436, 1951 1951.

LEV, N. et al. DJ-1 protects against dopamine toxicity. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 116, n. 2, p. 151-60, Feb 2009.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-677, 1988 1988.

LUCONI, M. et al. Uteroglobin and transglutaminase modulate human sperm functions. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 5, p. 676-88, Sep-Oct 2000.

LUEDTKE, C. C. et al. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1437-1448, May 2002.

MALM, J. et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4297-302, Jul 2000.

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal-vesicles bind to spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 4, p. 977-977, Apr 1994.

MANJUNATH, P. et al. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 3, p. 394-397, Mar 2009.

MANJUNATH, P. et al. Apolipoprotein-a-i binds to a family of bovine seminal plasma-proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 28, p. 16853-16857, Oct 5 1989.

MARIN-BRIGGILER, C. I. et al. Expression of epithelial cadherin in the human male reproductive tract and gametes and evidence of its participation in fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 10, p. 561-71, Oct 2008.

MARRS, J. A.; NELSON, W. J. Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. **International review of cytology**, v. 165, p. 159-205, 1996.

MATOUSEK, J.; KLAUDY, J. Qualitative and quantitative analyses of seminal ribonuclease in reproductive tract fluids of bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 51, n. 2, p. 111-118, Apr 30 1998.

MCCAULEY, T. C. et al. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 3, p. 336-341, Mar 2001.

MCGOWAN, M. R. et al. Bull selection and use in northern Australia. 1. Physical traits. **Anim Reprod Sci**, v. 71, n. 1-2, p. 25-37, May 15 2002.

MELIAN, E. B. et al. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. **Journal of virology**, v. 84, n. 3, p. 1641-7, Feb 2010.

METAYER, S. et al. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1219-1229, May 2002.

MILLER, D.; BROUGH, S.; AL-HARBI, O. Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 7, n. 5, p. 637-45, May 1992.

MOLLAN, T. L. et al. Alpha-hemoglobin stabilizing protein (AHSP) markedly decreases the redox potential and reactivity of alpha subunits of human HbA with hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, Dec 21 2012.

MONACO, E. et al. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 450-457, Feb 2009.

MORALES, P. et al. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 18, n. 5, p. 1010-7, May 2003.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1487, n. 1, p. 24-32, Aug 24 2000.

MORTARINO, M. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 797-801, May 1998.

MOSTOV, K. E.; FRIEDLANDER, M.; BLOBEL, G. The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. **Nature**, v. 308, n. 5954, p. 37-43, Mar 1-7 1984.

MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 3-10, Jan-Mar 2005.

MOURA, A. A. et al. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 534-541, Jul-Aug 2006.

_____. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, Apr 2007.

MOURA, A. A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, Mar-Apr 2006.

MOURA, A. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, Sep 10 2010.

MURTHY, A. R. K. et al. *In vitro* candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 11, p. 6291-6301, Dec 1 1993.

NAGAKUBO, D. et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 231, n. 2, p. 509-13, Feb 13 1997.

NOSKE, I. G.; GOODING, M. Evidence of a uteroglobin-like protein in epithelial cells of reproductive and non-reproductive tissues of the rabbit. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 193-6, Sep 1978.

NOUWENS, A. S. et al. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Electrophoresis**, v. 21, n. 17, p. 3797-809, Nov 2000.

OCHS, D.; WOLF, D. P. Actin in ejaculated human sperm cells. **Biology of reproduction**, v. 33, n. 5, p. 1223-6, Dec 1985.

PELOILLE, S. et al. Interactions between ovine cathepsin L, cystatin C and alpha(2)-macroglobulin - Potential role in the genital tract. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, n. 1, p. 140-146, Feb 15 1997.

PETERSEN, B. H. et al. Human seminal plasma inhibition of complement. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 96, n. 4, p. 582-91, Oct 1980.

PETERSSON, U. et al. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. **Bone**, v. 34, n. 6, p. 949-60, Jun 2004.

PUROHIT, S. et al. Impaired E-cadherin expression in human spermatozoa in a male factor infertility subset signifies E-cadherin-mediated adhesion mechanisms operative in sperm-oolemma interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 3, p. 903-9, Apr 9 2004.

QUAYLE, A. J.; JAMES, K. Immunosuppression by seminal plasma and its possible biological significance. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 38, n. 1-2, p. 87-100, 1990 1990.

RACZEK, S. et al. Immunocytochemical localization of some lysosomal hydrolases, their presence in luminal fluid and their directional secretion by human epididymal cells in culture. **Cell and Tissue Research**, v. 280, n. 2, p. 415-425, May 1995.

RADER, D. J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 12, p. 3090-3100, Dec 2006.

RAWE, V. Y. et al. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 3, p. 573-80, Mar 2008.

RED-HORSE, K. et al. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 18, p. 4097-106, Sep 2005.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2631-9, Jun 1 2004.

REYES-MORENO, C. et al. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 159-66, Jan 2002.

RITONJA, A. et al. The complete amino-acid-sequence of bovine cathepsin-s and a partial sequence of bovine cathepsin-l. **Febs Letters**, v. 283, n. 2, p. 329-331, Jun 3 1991.

ROTH, J. et al. MRP 8 and MRP14, s-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma-membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. **Blood**, v. 82, n. 6, p. 1875-1883, Sep 15 1993.

ROUDEBUSH, W. E.; DIEHL, J. R. Platelet-activating factor content in boar spermatozoa correlates with fertility. **Theriogenology**, v. 55, n. 8, p. 1633-1638, May 1 2001.

ROUDEBUSH, W. E.; PURNELL, E. T. Platelet-activating factor content in human spermatozoa and pregnancy outcome. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 2, p. 257-260, Aug 2000.

SANCHEZ, L. M.; LOPEZOTIN, C.; BJORKMAN, P. J. Biochemical characterization and crystallization of human Zn-alpha(2)-glycoprotein, a soluble class I major histocompatibility complex homolog. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4626-4630, Apr 29 1997.

SANKHALA, R. S.; SWAMY, M. J. The major protein of bovine seminal plasma, PDC-109, is a molecular chaperone. **Biochemistry**, v. 49, n. 18, p. 3908-3918, May 11 2010.

SANZ, L. et al. The complete primary structure of the spermadhesin awn, a zona-pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. **Febs Letters**, v. 300, n. 3, p. 213-218, Apr 6 1992.

SENSIBAR, J. A. et al. Localization and molecular heterogeneity of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) among ventral prostate, seminal vesicle, testis, and epididymis of rats. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 2, p. 233-42, Aug 1993.

SHAO, C. et al. Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2. **J Biol Chem**, v. 281, n. 42, p. 31689-95, Oct 20 2006.

SHIVAJI, S. et al. Localization of bovine seminal plasma rna-a bs1, on the surface of bovine spermatozoa. **Cellular and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 285-291, 1989 1989.

SHOJAEI SAADI, H. A. et al. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal of proteomics**, v. 82, p. 64-80, Apr 26 2013.

SILKENSEN, J. R.; SCHWOCHAU, G. B.; ROSENBERG, M. E. The role of clusterin in tissue-injury. **Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 72, n. 11-12, p. 483-488, Nov-Dec 1994.

SILKENSEN, J. R. et al. Clusterin promotes the aggregation and adhesion of renal porcine epithelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 6, p. 2646-2653, Dec 1995.

SINGLETON, C. L.; KILLIAN, G. J. A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. **Journal of Andrology**, v. 4, n. 2, p. 150-6, Mar-Apr 1983.

SIRIGU, P.; PERRA, M. T.; TURNO, F. Immunohistochemical study of secretory IgA in the human male reproductive tract. **Andrologia**, v. 27, n. 6, p. 335-9, Nov-Dec 1995.

SNEL, B. et al. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 18, p. 3442-4, Sep 15 2000.

SOLIS, D. et al. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. **Febs Letters**, v. 431, n. 2, p. 273-278, Jul 17 1998.

SOTTRUPJENSEN, L. Alpha-macroglobulins - structure, shape, and mechanism of proteinase complex-formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 20, p. 11539-11542, Jul 15 1989.

SOUZA, C. E. A. et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4436-56, 2012-Jul-19 2012.

STAFFORINI, D. M. et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 17895-17898, Jul 18 1997.

SUTOVSKY, P. et al. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1625-37, Nov 2004.

SUZUKI, K. et al. Bovine plasma protein-c inhibitor with structural and functional homologous properties to human plasma protein-c inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v. 107, n. 3, p. 381-388, Mar 1990.

SYLVESTER, S. R. et al. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive-tract of the male-rat. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 1, p. 195-207, Jul 1991.

TADA, T. et al. Immunohistochemical localization of zn-alpha-2-glycoprotein in normal human tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1221-1226, Sep 1991.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 4, p. 768-76, Oct 1998.

_____. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 3, p. 590-8, Sep 1999.

TJABRINGA, G. S. et al. Host defense effector molecules in mucosal secretions. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 151-8, Aug 1 2005.

TOPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 159-170, Oct 2005.

TULSIANI, D. R.; ORGEBIN-CRIST, M. C.; SKUDLAREK, M. D. Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 53, p. 85-97, 1998 1998.

URADE, Y.; WATANABE, K.; HAYAISHI, O. Prostaglandin-d, prostaglandin-e, and prostaglandin-f synthases. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 12, n. 2-3, p. 257-273, Oct 1995.

UTLEG, A. G. et al. Proteomic analysis of human prostasomes. **The Prostate**, v. 56, n. 2, p. 150-61, Jul 1 2003.

VALENCIA, C. A. et al. Modulation of nucleobindin-1 and nucleobindin-2 by caspases. **Febs Letters**, v. 582, n. 2, p. 286-90, Jan 23 2008.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 1, p. 39-39, 2003 Apr 2003.

WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cdna cloning of the messenger-rna of a new growth-factor from bovine seminal plasma - acidic seminal fluid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 183, n. 1, p. 232-237, Feb 28 1992.

XIAO, F. et al. Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for sp family transcription factors. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 12, p. 2964-2978, Dec 2005.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 2, n. 4, p. 371-2, Nov 1994.

YOSHIDA, H.; SATOH, K.; IMAIZUMI, T. Activity of platelet-activating-factor acetylhydrolase exists in red-cell membrane. **American Journal of Hematology**, v. 40, n. 1, p. 61-63, May 1992.

YOSHIDA, K. et al. Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, n. 4, p. 391-7, Dec 2003.

YU, H. H. et al. Stable overexpression of DJ-1 protects H9c2 cells against oxidative stress under a hypoxia condition. **Cell Biochemistry and Function**, Jan 1 2013.

YUASA, H. et al. Bovine protein C inhibitor has a unique reactive site and can transiently inhibit plasmin. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, n. 2, p. 262-267, Feb 2000.

ZALATA, A. et al. Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. **The Journal of urology**, v. 188, n. 4, p. 1260-4, Oct 2012.

ZALATA, A. et al. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 761-764, Apr 1996.

ZHOU, W.; FREED, C. R. DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity. **J Biol Chem**, v. 280, n. 52, p. 43150-8, Dec 30 2005.

ZIV, S.; RUFAS, O.; SHALGI, R. Cadherins expression during gamete maturation and fertilization in the rat. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 4, p. 547-56, Aug 2002.

ANEXO I

Tabela 2. Proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (MALDI-TOF e ESI-qTOFMS). Os números dos *spots* referem-se aos mostrados na Figura 1.

Proteína	kDa/pI experimentais	Número de acesso Swissprot/NCBI nr	Escore MS/MS da proteína	Sequência coberta (%)	Média do total da intensidade (%) ± EP**
<i>Spermadhesin-1 (Bos taurus)</i>					4,5±0,41
<i>Spot 01</i>	9,3/3,9	82571576	102	73	
<i>Spot 02</i>	11,1/4,3	82571576	60	61	
<i>Spot 03</i>	10,7/4,6	82571576	108	73	
<i>Spot 08*</i>	9,4/6,2	SPAD1_BOVIN	1088	57	
<i>Spot 09*</i>	10,2/6,3	SPAD1_BOVIN	522	57	
<i>Binder of sperm protein 3 (Bos taurus)</i>					2,75±0,19
<i>Spot 08*</i>	9,4/6,2	SFP3_BOVIN	278	17	
<i>Spot 09*</i>	10,2/6,3	SFP3_BOVIN	586	20	
<i>Spot 11*</i>	15,6/6,5	SFP3_BOVIN	99	15	
<i>Spot 21*</i>	14,4/9,0	SFP3_BOVIN	139	11	
<i>Spot 26*</i>	9,7/9,4	SFP3_BOVIN	132	15	

<i>Spot 35*</i>	19,3/9,1	SFP3_BOVIN	74	14	
<i>Binder of sperm protein 1 (Bos taurus)</i>					49,8±0,41
<i>Spot 04</i>	14,4/4,2	219521812	73	55	
<i>Spot 05</i>	14,2/4,6	219521812	83	47	
<i>Spot 06</i>	12,1/5,0	219521812	66	74	
<i>Spot 07</i>	13,4/5,7	219521812	75	77	
<i>Spot 08*</i>	9,4/6,2	SFP1_BOVIN	48	7	
<i>Spot 09*</i>	10,2/6,3	SFP1_BOVIN	54	7	
<i>Spot 11*</i>	15,6/6,5	SFP1_BOVIN	367	21	
<i>Spot 12*</i>	18,3/6,6	SFP1_BOVIN	1001	48	
<i>Spot 21*</i>	14,4/9,0	SFP1_BOVIN	369	22	
<i>Spot 26*</i>	9,7/9,4	SFP1_BOVIN	2317	52	
<i>Spermadhesin Z13 precursor (Bos taurus)</i>					5,13±0,40
<i>Spot 10</i>	11,8/6,2	126158907	85	52	
<i>Spot 11*</i>	15,6/6,5	Z13_BOVIN	96	12	
<i>Spot 14</i>	12,0/7,5	126158907	101	48	

<i>Spot 15</i>	11,3/7,8	126158907	78	52	
<i>Spot 16</i>	11,9/8,0	126158907	117	52	
<i>Spot 21*</i>	14,4/9,0	Z13_BOVIN	109	12	
<i>Spot 43*</i>	25,0/7,2	Z13_BOVIN	228	43	
<hr/>					
<i>Catelicidina-1 (Ovis aries)</i>					0,59±0,10
<i>Spot 13</i>	11,9/6,9	57526341	103	54	
<hr/>					
<i>Epididymal secretory protein E1 (Bos taurus)</i>					2,02±0,14
<i>Spot 08*</i>	9,4/6,2	NPC2_BOVIN	96	15	
<i>Spot 11*</i>	15,6/6,5	NPC2_BOVIN	5316	66	
<i>Spot 12*</i>	18,3/6,6	NPC2_BOVIN	353	32	
<i>Spot 17</i>	14,4/7,7	27806881	88	53	
<i>Spot 19</i>	15,7/9,5	27806881	78	46	
<i>Spot 20*</i>	15,1/9,2	NPC2_BOVIN	3711	71	
<i>Spot 21*</i>	14,4/9,0	NPC2_BOVIN	311	40	
<i>Spot 83*</i>	33,6/9,3	NPC2_BOVIN	96	15	
<hr/>					
<i>Protein S100-A9 (Bos taurus)</i>					0,08±0,02

<i>Spot 18*</i>	17,9/8,0	S10A9_BOVIN	310	16	
<hr/>					
<i>Similar to beta 2-microglobulin (Bos taurus)</i>					1,20±0,09
<i>Spot 22</i>	10,4/8,4	28189603	111	81	
<i>Spot 23</i>	10,3/8,8	28189603	76	30	
<i>Spot 24</i>	7,2/7,9	28189603	88	61	
<i>Spot 27*</i>	9,2/9,6	B2MG_BOVIN	81	8	
<hr/>					
<i>Hemoglobin subunit alpha (Bos taurus)</i>					1,09±0,11
<i>Spot 26*</i>	9,7/9,4	HBA_BOVIN	1092	57	
<hr/>					
<i>Seminal ribonuclease (Bos taurus)</i>					2,54±0,18
<i>Spot 08*</i>	9,4/6,2	RNS_BOVIN	48	13	
<i>Spot 09*</i>	10,2/6,3	RNS_BOVIN	65	13	
<i>Spot 11*</i>	15,6/6,5	RNS_BOVIN	44	24	
<i>Spot 12*</i>	18,3/6,6	RNS_BOVIN	64	13	
<i>Spot 28*</i>	14,7/9,6	RNS_BOVIN	644	43	
<i>Spot 29*</i>	15,0/10,1	RNS_BOVIN	1253	39	
<i>Spot 30*</i>	13,7/10,6	RNS_BOVIN	4401	51	

<i>Spot 31*</i>	19,8/11,0	RNS_BOVIN	351	39	
<i>Spot 82*</i>	32,4/9,7	RNS_BOVIN	58	13	
<i>Spot 84*</i>	39,2/9,3	RNS_BOVIN	47	13	
<hr/>					
<i>Cadherin-1 (Bos taurus)</i>					0,10±0,03
<i>Spot 29*</i>	15,0/10,1	CADH1_BOVIN	227	1	
<hr/>					
<i>Angiogenin-1 (Bos taurus)</i>					0,65±0,09
<i>Spot 29*</i>	15,0/10,1	ANG1_BOVIN	195	17	
<i>Spot 30*</i>	13,7/10,6	ANG1_BOVIN	2185	48	
<hr/>					
<i>Cathelicidin-7 (Bos taurus)</i>					
<i>Spot 32*</i>	27,1/10,3	CTHL7_BOVIN	63	10	
<hr/>					
<i>Cathelicidina-3 (Bos taurus)</i>					0,11±0,02
<i>Spot 31*</i>	19,8/11,0	CTHL3_BOVIN	71	7	
<hr/>					
<i>Ribonuclease -4 (Bos taurus)</i>					0,56±0,06
<i>Spot 31*</i>	19,8/11,0	RNAS4_BOVIN	263	28	
<i>Spot 35*</i>	19,3/9,1	RNAS4_BOVIN	49	10	
<hr/>					
<i>Fibrinogen alpha chain (Bos taurus)</i>					0,47±0,12

<i>Spot 32*</i>	27,1/10,3	FIBA_BOVIN	308	6
<i>Spot 33*</i>	26,5/9,9	FIBA_BOVIN	297	9
<i>Spot 82*</i>	32,4/9,7	FIBA_BOVIN	339	6
<i>Spot 84*</i>	39,2/9,3	FIBA_BOVIN	294	11
<i>Ephirin-A1 (Bos taurus)</i>				0,46±0,06
<i>Spot 34</i>	21,9/9,3	77735537	52	22
<i>Spot 35*</i>	19,3/9,1	EFNA1_BOVIN	283	19
<i>Metalloproteinase inhibitor 2 (Bos taurus)</i>				6,28±0,48
<i>Spot 08*</i>	9,4/6,2	TIMP2_BOVIN	76	6
<i>Spot 20*</i>	15,1/9,2	TIMP2_BOVIN	102	6
<i>Spot 28*</i>	14,7/9,6	TIMP2_BOVIN	108	6
<i>Spot 32*</i>	27,1/10,3	TIMP2_BOVIN	61	6
<i>Spot 35</i>	23,7/8,9	TIMP2_BOVIN	1606	57
<i>Spot 37</i>	23,2/8,6	296476071	97	37
<i>Spot 38</i>	24,5/8,4	296476071	68	59
<i>Spot 39</i>	24,3/8,2	296476071	97	37

<i>Spot 40</i>	24,4/8,0	296476071	120	47	
<i>Spot 41</i>	24,7/7,6	296476071	124	62	
<i>Spot 42*</i>	30,5/8,1	TIMP2_BOVIN	60	6	
<i>Spot 43*</i>	25,0/7,2	TIMP2_BOVIN	5178	85	
<i>Spot 44*</i>	25,0/7,2	TIMP2_BOVIN	262	16	
<i>Spot 45*</i>	29,3/6,9	TIMP2_BOVIN	104	13	
<i>Protein DJ-1 (Bos taurus)</i>					0,03±0,01
<i>Spot 46*</i>	25,8/6,1	PARK7_BOVIN	1331	56	
<i>Prostaglandin-H2 D-isomerase (Bos taurus)</i>					0,03±0,01
<i>Spot 47*</i>	31,0/6,2	PTGDS_BOVIN	1054	20	
<i>Glutathione peroxidase 3 (Bos taurus)</i>					1,69±0,25
<i>Spot 44*</i>	25,0/7,2	GPX3_BOVIN	104	16	
<i>Spot 46*</i>	25,8/6,1	GPX3_BOVIN	494	34	
<i>Spot 48*</i>	29,6/5,9	GPX3_BOVIN	191	21	
<i>Spot 49*</i>	28,7/5,9	GPX3_BOVIN	631	40	
<i>Spot 52*</i>	32,2/4,6	GPX3_BOVIN	43	5	

<i>Apolipoprotein A-I (Bos taurus)</i>					3,49±0,39
<i>Spot 25*</i>	10,7/9,2	APOA1_BOVIN	1537	57	
<i>Spot 47*</i>	31,0/6,2	APOA1_BOVIN	185	11	
<i>Spot 48*</i>	29,6/5,9	APOA1_BOVIN	739	46	
<i>Spot 49*</i>	28,7/5,9	APOA1_BOVIN	359	16	
<i>Spot 50*</i>	29,9/5,6	APOA1_BOVIN	4051	75	
<i>Spot 51*</i>	29,8/5,0	APOA1_BOVIN	18566	81	
<i>Spot 52*</i>	32,2/4,6	APOA1_BOVIN	18564	81	
<i>Spot 53*</i>	41,3/4,7	APOA1_BOVIN	463	19	
<i>Proteasome subunit beta type-4 (Bos taurus)</i>					0,62±0,22
<i>Spot 50*</i>	28,7/5,9	PSB4_BOVIN	99	9	
<i>Binder of sperm protein 5 (Bos taurus)</i>					3,26±0,23
<i>Spot 44*</i>	25,0/7,2	SFP4_BOVIN	58	9	
<i>Spot 54</i>	28,5/3,6	28849953	89	20	
<i>Spot 55*</i>	28,6/3,4	SFP4_BOVIN	1348	47	
<i>Spot 56*</i>	28,8/3,3	SFP4_BOVIN	1321	46	

<i>Spot 57</i>	28,8/3,2	28849953	70	31
<i>Spot 58*</i>	28,7/3,1	SFP4_BOVIN	2368	46
<i>Clusterin (Bos taurus)</i>				7,39±0,54
<i>Spot 11*</i>	15,6/6,5	CLUS_BOVIN	184	6
<i>Spot 53*</i>	41,3/4,7	CLUS_BOVIN	2795	20
<i>Spot 59</i>	48,7/4,1	27806907	63	22
<i>Spot 60</i>	47,8/4,2	27806907	54	14
<i>Spot 61</i>	47,5/4,3	27806907	58	14
<i>Spot 62</i>	47,5/4,4	27806907	57	14
<i>Spot 63</i>	47,6/4,6	27806907	59	21
<i>Spot 64*</i>	55,4/4,2	CLUS_BOVIN	1414	32
<i>Spot 65*</i>	55,5/4,3	CLUS_BOVIN	1621	33
<i>Spot 66*</i>	54,1/4,4	CLUS_BOVIN	1940	33
<i>Spot 67*</i>	53,6/4,6	CLUS_BOVIN	1765	33
<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein (Bos taurus)</i>				2,65±0,27
<i>Spot 64*</i>	55,4/4,2	ZA2G_BOVIN	850	40

<i>Spot 65*</i>	55,5/4,3	ZA2G_BOVIN	595	29	
<i>Spot 66*</i>	54,1/4,4	ZA2G_BOVIN	424	29	
<i>Spot 67*</i>	53,6/4,6	ZA2G_BOVIN	432	29	
<hr/>					
<i>Serpin A3-7 (Bos taurus)</i>					1,39±0,14
<i>Spot 64*</i>	55,4/4,2	SPA37_BOVIN	156	9	
<i>Spot 65*</i>	55,5/4,3	SPA37_BOVIN	76	7	
<hr/>					
<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase (Bos taurus)</i>					0,07±0,03
<i>Spot 68</i>	59,0/5,1	2497684	86	23	
<i>Spot 69</i>	57,8/5,3	2497684	94	24	
<i>Spot 71</i>	56,8/5,6	2497684	65	19	
<hr/>					
<i>Actin, cytoplasmic 2 (Bos taurus)</i>					0,10±0,01
<i>Spot 70</i>	52,9/5,1	54036676	80	26	
<hr/>					
<i>Albumin (Bos taurus)</i>					5,61±0,5
<i>Spot 11*</i>	15,6/6,5	ALBU_BOVIN	151	8	
<i>Spot 12*</i>	18,3/6,6	ALBU_BOVIN	141	5	
<i>Spot 43*</i>	25,0/7,2	ALBU_BOVIN	2358	30	

<i>Spot 44*</i>	25,0/7,2	ALBU_BOVIN	5133	30
<i>Spot 72*</i>	49,7/5,6	ALBU_BOVIN	9454	58
<i>Spot 73*</i>	50,7/6,0	ALBU_BOVIN	8268	62
<i>Spot 74*</i>	52,2/6,2	ALBU_BOVIN	4118	51
<i>Spot 75</i>	66,2/5,4	1351907	134	39
<i>Spot 76</i>	65,9/5,7	1351907	73	20
<i>Spot 77</i>	66,0/6,0	1351907	89	27
<i>Spot 78</i>	65,6/6,3	1351907	79	26
<i>Spot 79</i>	65,4/6,6	1351907	127	33
<i>Spot 103*</i>	69,1/6,4	ALBU_BOVIN	14676	72
<i>Spot 104*</i>	69,5/6,3	ALBU_BOVIN	11649	72
<i>Spot 105*</i>	69,9/6,2	ALBU_BOVIN	12812	71
<i>Spot 106*</i>	70,6/6,0	ALBU_BOVIN	8331	71
<i>Spot 107*</i>	71,2/5,9	ALBU_BOVIN	5807	60

Osteopontin-K (Bos taurus)

0,21±0,03

<i>Spot 108*</i>	65,5/4,5	OSTK_BOVIN	21	6
------------------	----------	------------	----	---

<i>Alpha-2-macroglobulin (Bos taurus)</i>					0,01±0,00
<i>Spot 74*</i>	52,2/6,2	A2MG_BOVIN	184	03	
<i>Tripeptidyl-peptidase 1 (Bos taurus)</i>					1,91±0,33
<i>Spot 103*</i>	69,1/6,4	TPP1_BOVIN	210	10	
<i>Spot 104*</i>	69,5/6,3	TPP1_BOVIN	141	7	
<i>Spot 105*</i>	69,9/6,2	TPP1_BOVIN	57	2	
<i>Cathepsin L1 (Bos taurus)</i>					0,03±0,01
<i>Spot 80*</i>	42,7/7,0	CATL1_BOVIN	5618	58	
<i>Cathepsin S (Bos taurus)</i>					0,90±0,13
<i>Spot 42*</i>	30,5/8,1	CATS_BOVIN	332	18	
<i>Spot 43*</i>	25,0/7,2	CATS_BOVIN	151	9	
<i>Annexin A1 (Bos taurus)</i>					0,11±0,01
<i>Spot 80*</i>	42,7/7,0	ANXA1_BOVIN	2501	63	
<i>Spot 81</i>	45,1/7,6	73853762	79	37	
<i>Spot 84*</i>	39,2/9,3	ANXA1_BOVIN	121	4	
<i>Phosphoglycerate kinase 1 (Bos taurus)</i>					0,03±0,01

<i>Spot 85*</i>	46,6/8,9	PGK1_BOVIN	2649	47	
<i>Alpha-enolase (Bos taurus)</i>					0,05±0,01
<i>Spot 86</i>	56,0/7,7	109940077	60	29	
<i>Serotransferrin (Bos taurus)</i>					0,34±0,04
<i>Spot 82*</i>	32,4/9,7	TRFE_BOVIN	56	2	
<i>Spot 87</i>	67,3/7,9	2501351	81	16	
<i>Spot 88*</i>	66,3/8,2	TRFE_BOVIN	74	02	
<i>Spot 89*</i>	65,6/8,4	TRFE_BOVIN	620	16	
<i>Spot 91*</i>	71,7/8,0	TRFE_BOVIN	8551	65	
<i>Spot 92*</i>	71,2/8,2	TRFE_BOVIN	8858	68	
<i>Spot 93*</i>	70,9/8,4	TRFE_BOVIN	8847	70	
<i>Lactotransferrin (Bos taurus)</i>					0,23±0,04
<i>Spot 91*</i>	71,7/8,0	TRFL_BOVIN	178	3	
<i>Spot 92*</i>	71,2/8,2	TRFL_BOVIN	190	6	
<i>Spot 93*</i>	70,9/8,4	TRFL_BOVIN	226	4	
<i>Fibrinogen beta chain (Bos taurus)</i>					0,21±0,04

<i>Spot 73*</i>	50,7/6,0	FIBB_BOVIN	164	8	
<i>Spot 88*</i>	66,3/8,2	FIBB_BOVIN	2288	40	
<i>Spot 89*</i>	65,6/8,4	FIBB_BOVIN	7018	79	
<i>Spot 90*</i>	66,1/8,7	FIBB_BOVIN	6716	70	
<hr/> <i>Plasma serine protease inhibitor (Bos taurus)</i>					0,17±0,03
<i>Spot 88*</i>	66,3/8,2	IPSP_BOVIN	175	12	
<i>Spot 89*</i>	65,6/8,4	IPSP_BOVIN	409	20	
<i>Spot 90*</i>	66,1/8,7	IPSP_BOVIN	408	22	
<hr/> <i>Complement factor B (Bos taurus)</i>					0,13±0,02
<i>Spot 94*</i>	78,7/9,0	CFAB_BOVIN	1831	27	
<i>Spot 95*</i>	78,8/8,8	CFAB_BOVIN	2819	46	
<i>Spot 96*</i>	78,9/8,6	CFAB_BOVIN	1765	29	
<i>Spot 97*</i>	79,7/8,4	CFAB_BOVIN	3093	45	
<hr/> <i>Polymeric immunoglobulin receptor (Bos taurus)</i>					0,40±0,12
<i>Spot 98</i>	74,5/7,7	3914346	80	20	

<i>Spot 99</i>	74,7/7,4	3914346	91	22	
<i>Spot 100</i>	74,8/7,1	3914346	99	23	
<i>Spot 101</i>	75,6/6,9	3914346	74	22	
<i>Spot 102</i>	76,1/6,6	3914346	75	21	
<hr/>					
<i>Heat shock 70 kDa protein 1A (Bos taurus)</i>					1,59±0,20
<i>Spot 66*</i>	54,1/4,4	HS71A_BOVIN	76	1	
<i>Spot 105*</i>	69,9/6,2	HS71A_BOVIN	204	7	
<i>Spot 106*</i>	70,6/6,0	HS71A_BOVIN	175	4	
<hr/>					
<i>Nucleobinding-1 (Bos taurus)</i>					0,26±0,03
<i>Spot 42*</i>	30,5/8,1	NUCB1_BOVIN	62	2	
<i>Spot 108*</i>	65,5/4,5	NUCB1_BOVIN	5316	52	

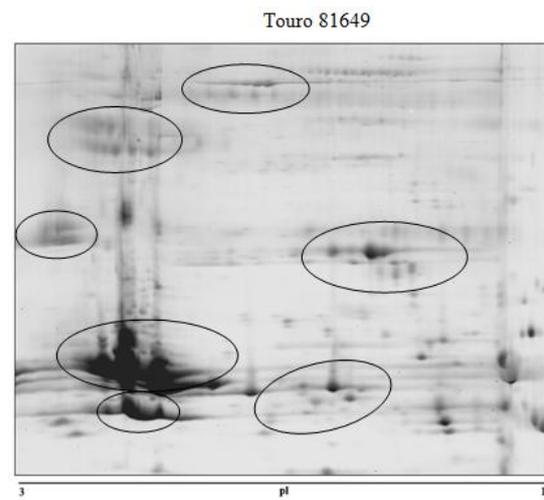
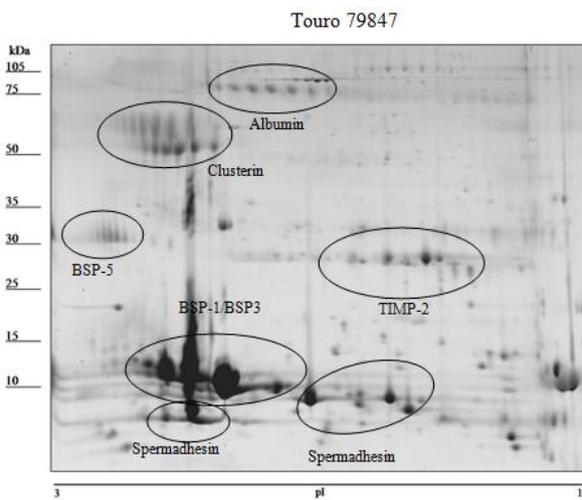
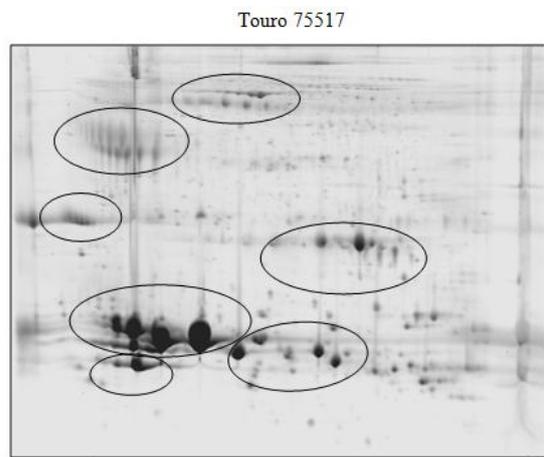
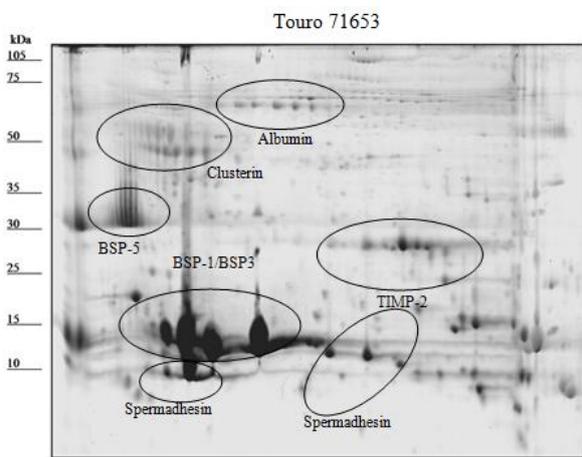
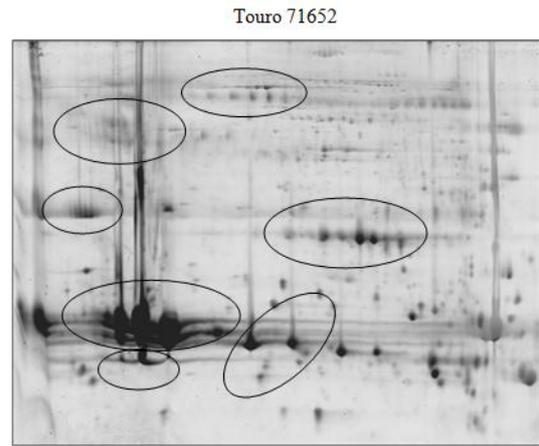
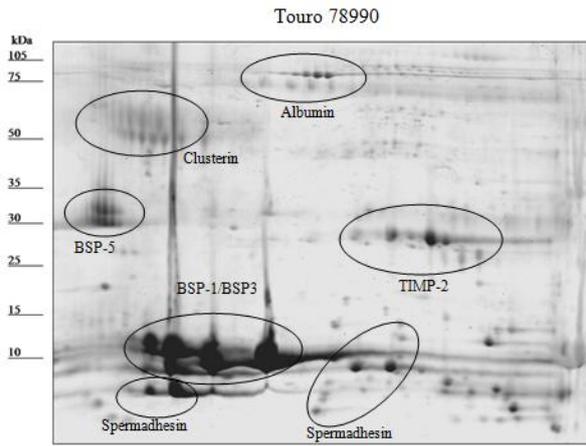
*Proteínas identificadas por *ESI-qTOFMS*.

**A soma das porcentagens excede 100% por que, em alguns casos, há mais de uma proteína detectada por *spot*.

Tabela 4. Proteínas do plasma seminal d touros *Bos indicus* associadas com a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais aos 24 meses de idade (PEN24). As proteínas foram identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (*ESI-qTOFMS*). Os números dos spots referem-se aos mostrados na Figura 1

Número dos <i>Spots</i> e proteínas identificadas	kDa/pI Experimentais	Número de acesso Swissprot	Escore do íon MS/MS	Sequencia coberta (%)
Efeito positivo na PEN24				
<i>Spot 52</i>				
<i>Apolipoprotein A-I (Bos taurus)</i>	32.2/4.6	APOA1_BOVIN	17763	81
<i>Glutathione peroxidase 3 (Bos taurus)</i>	32.2/4.6	GPX3_BOVIN	61	5
<i>Spot 46</i>				
<i>Protein DJ-1 (Bos taurus)</i>	25.8/6.1	PARK7_BOVIN	1524	56
<i>Glutathione peroxidase 3 (Bos taurus)</i>	25.6/6.1	GPX3_BOVIN	545	34
<i>Spot 85</i>				
<i>Phosphoglycerate kinase 1 (Bos taurus)</i>	46.6/8.9	PGK1_BOVIN	1341	35
<i>Spot 25</i>				
<i>Apolipoprotein A-I (Bos taurus)</i>	10.7/9.2	APOA1_BOVIN	350	23
<i>Secretoglobin family 1D member (Bos taurus)</i>	10.7/9.2	SG1D_BOVIN	988	19
Efeito negativo na PEN24				
<i>Spot 53</i>				
<i>Clusterin (Bos taurus)</i>	41.3/4.7	CLUS_BOVIN	903	17
<i>Apolipoprotein A-I (Bos taurus)</i>	41.3/4.7	APOA1_BOVIN	426	19
<i>Spot 20</i>				

<i>Epididymal secretory protein E1 (Bos taurus)</i>	15.1/9.2	NPC2_BOVIN	483	54
<i>Metalloproteinase inhibitor 2 precursor (Bos taurus)</i>	15.1/9.2	TIMP_BOVIN	111	6



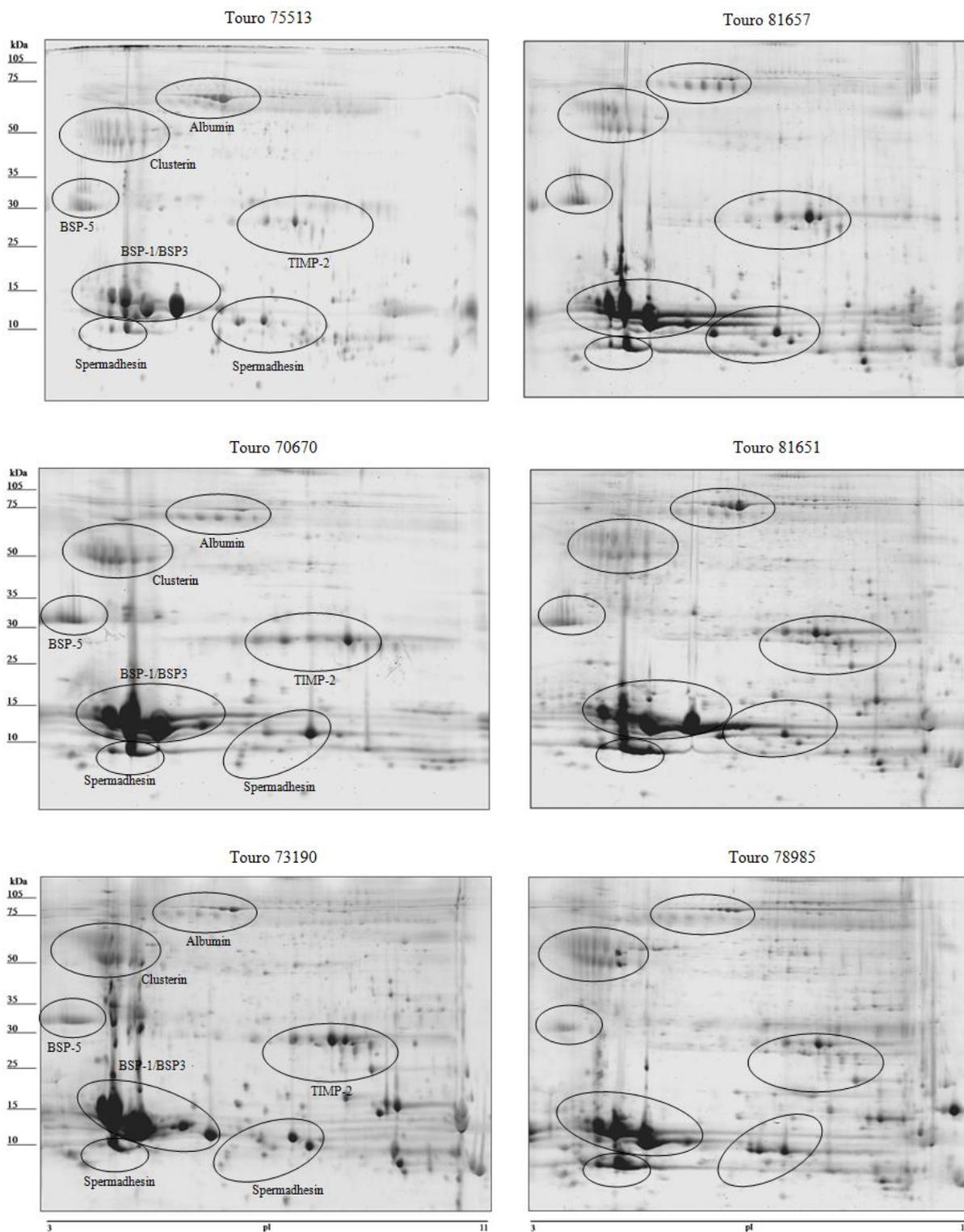


Figura suplementar 1. Mapas bidimensionais do plasma seminal de touros *Bos indicus*. Os géis representam os membros do *match set* com os principais *spots* adicionados no gel *máster*. As imagens foram analisadas pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, USA). Os *spots* circulado representam os principais *clusters* de proteínas identificadas no plasma seminal.

CAPÍTULO III

PERFIL PROTEICO DO PLASMA SEMINAL OBTIDO POR VAGINA ARTIFICIAL INTERNA E ELETROEJACULAÇÃO DE TOUROS DA RAÇA BRAHMAN

Perfil proteico do plasma seminal obtido por vagina artificial interna e eletroejaculação de touros da raça Brahman

RESUMO

O presente estudo foi conduzido para investigar as mudanças no perfil proteico do plasma seminal de touros *Bos indicus*, submetidos a dois métodos de coleta de sêmen: vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ). O sêmen foi coletado de três touros no mesmo dia em quatro diferentes ocasiões no mês usando VAI seguido de EEJ ou EEJ seguido de VAI. O sêmen foi avaliado imediatamente após a coleta. As proteínas do plasma seminal foram separadas por eletroforese bidimensional em gel diferencial e identificadas por espectrometria de massas. O volume seminal foi maior ($p < 0,05$) no EEJ ($4,3 \pm 0,4$ mL) em comparação as amostras coletadas por VAI ($3,0 \pm 1,8$ mL). Em contrapartida, a concentração espermática foi maior em amostras coletadas com VAI ($1690 \pm 237 \times 10^6$ sperm/mL) comparada com amostras coletadas por EEJ ($315 \pm 64 \times 10^6$ sperm/mL). A motilidade espermática e a porcentagem de espermatozoides normais não diferiram entre os métodos de coleta ($p > 0,05$). A concentração total de proteínas no plasma seminal foi maior em amostras coletadas por VAI versus EEJ ($19,3 \pm 0,9$ vs. $13,0 \pm 1,8$ mg/mL, $p < 0,05$; respectivamente). Baseado nas análises dos géis bidimensionais, 22 *spots* tiveram volumes maiores nas amostras coletadas por VAI, correspondendo a 21 proteínas identificadas como *transferrin*, *albumin*, *metalloproteinase inhibitor 2*, *epididymal secretory glutathione peroxidase*, dentre outras. Em contrapartida, 33 *spots* correspondendo a 26 proteínas tiveram maiores volumes nos géis de amostras coletadas por EEJ. Estas proteínas foram identificadas como *spermadhesin-1*, *BSP 1 and 3* isoformas, *angiogenin-1*, *alpha-1B-glycoprotein*, *T-complex protein 1 subunit theta*, *phosphoglycerate kinase 2*, *clusterin*, *nucleobindin-1*, *cathepsins*, *complement factor B*, *spermadhesin Z13*, *BSP 5* e *annexins*, dentre outras. Assim, existem diferenças no perfil do plasma seminal coletados por EEJ

quando comparado com amostras coletadas por VAI. As principais proteínas com maior expressão em amostras obtidas por VAI e EEJ eram de origem epididimária e das glândulas sexuais acessórias, respectivamente.

Palavras-chave; bovinos, *Bos indicus*, coleta de sêmen, espermatozoide, proteômica

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate if differences exist in the seminal plasma protein profile from mature *Bos indicus* (Brahman) bulls using two methods of semen collection: electroejaculation (EEJ) and internal artificial vagina (IAV). Semen was collected from three bulls on the same day, on four different occasions over a month, by IAV followed by EEJ or EEJ followed by IAV. Semen was assessed immediately post-collection. Seminal plasma proteins were evaluated by 2-D fluorescence difference gel electrophoresis and identified by mass spectrometry. Semen volume was larger ($p < 0.05$) for EEJ (4.3 ± 0.4 mL) than for IAV samples (3.0 ± 1.8 mL). Conversely, sperm concentration was higher in IAV samples ($1690 \pm 237 \times 10^6$ sperm/mL) than EEJ samples ($315 \pm 64 \times 10^6$ sperm/mL). Sperm motility and the percentage of morphologically normal sperm were not different ($p > 0.05$). Total concentration of seminal plasma proteins was higher for semen collected by IAV versus EEJ (19.3 ± 0.9 vs. 13.0 ± 1.8 mg/mL, $p < 0.05$; respectively). Based on 2-D gels, 22 spots had significantly higher volumes in gels derived from IAV samples, corresponding to 21 proteins, identified as transferrin, albumin, metalloproteinase inhibitor 2, epididymal secretory glutathione peroxidase, among others. On the other hand, 33 spots, corresponding to 26 proteins, had higher volumes in gels derived from EEJ samples. These proteins were identified as spermadhesin-1, BSP 1 and 3 isoforms, angiogenin-1, alpha-1B-glycoprotein, T-complex protein 1 subunit theta, phosphoglycerate kinase 2, clusterin, nucleobindin-1, cathepsins, complement factor B, spermadhesin Z13, BSP 5 and annexins, among others. Thus, differences exist in the

seminal plasma profile of samples collected by EEJ compared to those collected by IAV. The main proteins with greater expression in samples obtained by IAV and EEJ were of epididymal origin and accessory sex glands, respectively.

Keywords: bovinos, *Bos indicus*, proteomics, spermatozoa, semen collection

INTRODUÇÃO

O plasma seminal é uma secreção complexa originada principalmente no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias, glândulas estas que contribuem com a maior parte do volume seminal. Proteínas do fluido do epidídimo conferem condições para a maturação espermática e proteção para os espermatozoides quando armazenados na cauda deste órgão, enquanto que os componentes do fluido das glândulas sexuais acessórias mediam eventos ligados à capacitação espermática e motilidade, reação acrossômica, proteção contra o estresse oxidativo e reações imunes, interação do espermatozoide com o epitélio do oviduto para a formação do reservatório espermático e fertilização (YANAGIMACHI, 1994; KRAUS et al., 2005; MOURA, 2005; MOURA et al., 2006b; MOURA et al., 2007a; SOUZA et al., 2008).

A avaliação andrológica de touros constitui uma importante ferramenta para a seleção dos melhores animais para sistemas de monta a campo ou como doadores de sêmen destinado à inseminação artificial. Em bovinos, a vagina artificial (VA) ou eletroejaculação (EEJ) representam os dois métodos mais comuns de coleta de sêmen. A VA é o método mais utilizado nas centrais de coleta de sêmen e permite a avaliação de atributos como o comportamento de monta e ejaculação (BARTH et al., 2004; CRUZ et al., 2011). No entanto, a coleta de sêmen por vagina artificial geralmente exige touros treinados, com capacidade de efetuar monta e permitir a proximidade de pessoas no momento da coleta (PARKINSON, 2004; PALMER, 2005). Nas coletas por EEJ, em comparação, é exigida a contenção de forma segura do touro, além de técnicos com formação adequada, com a vantagem de se obter sucesso na coleta de sêmen na maioria

dos animais (AUSTIN et al., 1961; PALMER, 2005). Porém, amostras coletadas por EEJ geralmente apresentam maior volume seminal e, conseqüentemente, menor concentração espermática (LEON et al., 1991; MARCO-JIMENEZ et al., 2008) quando comparadas com aquelas obtidas por vagina artificial.

A eletroejaculação é adequada para o caso de animais não treinados para uso da VA e também para a maioria das coletas em touros de corte. Recentemente, o uso de uma vagina artificial interna (VAI) foi descrito como um método de coleta de sêmen de touros (BARTH et al., 2004), o qual permite a avaliação do animal quanto à libido e comportamento de cópula (BARTH et al., 2004; CRUZ et al., 2011). A maioria dos estudos que investiga o perfil de plasma seminal de touros foi realizada em *Bos taurus* com amostras de sêmen coletados por vagina artificial convencional (KELLY et al., 2006; MOURA et al., 2007b). Estudos anteriores demonstraram que a concentração de proteína total do plasma seminal de carneiros não foi influenciada pelo método de coleta de sêmen (MARCO-JIMENEZ et al., 2008). Porém, este mesmo trabalho descreve que alguns *spots* nos géis bidimensionais do plasma seminal tiveram mudanças significativas, sugerindo que o perfil proteico deste fluido pode sofrer alterações devido ao método de coleta do sêmen, seja eletroejaculação ou vagina artificial convencional. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar as potenciais alterações nos parâmetros seminais e composição proteica do plasma seminal de touros *Bos indicus* (Brahman) submetidos a dois métodos diferentes de coleta de sêmen, eletroejaculação e vagina artificial interna.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

No presente experimento foram utilizados três touros *Bos indicus* da raça Brahman, com idade de 31 meses, com condição corporal 3 (1= muito magro – 5 muito gordo), pertencentes à *Cooperative Research Centre (CRC) for Beef Genetic*

Technologies sediada na Estação de Pesquisa Belmonte, na cidade de Rockhampton, Queensland, Austrália. O estudo foi realizado em maio de 2009 na Fazenda *Pinjarra Hills* pertencente à Universidade de Queensland, próximo a Brisbane, Austrália. Foram realizadas coletas de sêmen por EEJ e avaliações andrológicas para garantir que os animais apresentavam *status* reprodutivo normal (>70% de espermatozoides morfolologicamente normais) (FORDYCE et al., 2006) e com circunferência escrotal acima de 30 cm. O sêmen foi coletado de todos os animais no mesmo dia, em quatro diferentes ocasiões (1 vez por semana) no período de um mês. Em cada ocasião, a coleta por VAI foi seguida por EEJ com o mínimo de 2,5 h entre as duas coletas e, na coleta seguinte, o método foi alternado (EEJ seguido por VAI) e assim sucessivamente. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Queensland sob o número SVS/355/08/NSRSF.

Vagina artificial interna (VAI)

A vagina artificial interna utilizada no presente estudo foi preparada de acordo com (BARTH et al., 2004; CRUZ et al., 2011). Resumidamente, a VAI consiste numa haste de metal com um anel de metal com diâmetro de 7,5 cm, acoplada a uma das extremidades. Uma segunda haste de metal está ligada a uma vagina artificial de látex e as duas hastes são unidas por um tubo de plástico que permite o ajuste do comprimento do dispositivo para facilitar a acomodação dentro da vagina da vaca. O tubo de látex é ligado ao anel de metal, mantendo-o aberto, sendo colocado um saco de amostra fixado à extremidade do tubo de látex e dobrado para dentro do tubo (Figura 1).



Figura 1. Componentes da vaginal artificial interna utilizada em vacas. (a) consiste em uma haste de metal, em que uma das extremidades forma um círculo, com uma haste de metal inferior ligado a um tubo de látex, e um tubo de plástico flexível. (b) as duas hastes metálicas ligadas por um tubo de plástico flexível. (c) o tubo de látex acoplado ao círculo maior da haste de metal com função de manter a extremidade aberta. (d) saco coletor inserido ao dispositivo já montado (CRUZ et al., 2011).

Três vacas da raça Jersey, não gestantes, não lactantes, foram utilizadas como manequins para as coletas de sêmen. As vacas tiveram o estro induzido com 500 µg de cloprostenol (Estrumate, Schering-Plough Animal Health, Australia) por via intramuscular e dois dias depois receberam uma injeção de 2 mg de benzoato de estradiol (Cidirol, Genetics Australia, Bacchus Marsh, Victoria, Australia) também por via intramuscular. As vacas foram observadas quanto ao comportamento de estro quando montavam e se deixavam montar, e as coletas de sêmens foram efetuadas durante a manhã. Uma vaca era contida pela cabeça em um brete (ENTWISTLE;

FORDYCE 2003) dentro de um curral de aproximadamente 100 m² de tamanho, sendo utilizada para avaliar os três touros.

A VAI foi lubrificada externamente e internamente com lubrificante não espermicida (1mL) e inserida cuidadosamente na vagina da manequim. Fez-se o ajuste do tamanho da VAI de acordo com o comprimento da vagina e a extremidade do anel de metal foi colocada apenas no interior do esfíncter vestibular. Os touros tinham o prepúcio lavado com solução salina (50-60 mL 0,9%) e eram introduzidos dentro do curral, um de cada vez, sendo que os demais touros permaneceram em um curral ao lado do local de coleta, o que permitia a observação visual da monta. Uma nova VAI foi utilizada para cada touro.

Eletroejaculação

Antes da coleta de sêmen por EEJ, procedeu-se à lavagem do prepúcio dos touros como acima mencionado, remoção das fezes e massagem na próstata e nas glândulas ampulares por aproximadamente 1 minuto. Uma *probe* lubrificada (75 mm de diâmetro; Standard Bull Probe, Lane Manufacturing, Denver, CO, USA) foi introduzida no reto do animal e, em seguida, aplicados estímulos crescentes de 2 segundos, com intervalos de 2 segundos (Pulsator IV, Lane Manufacturing, Denver, CO, USA), até a coleta de no mínimo de 2 mL de sêmen.

Avaliação dos parâmetros seminais

Todas as amostras de sêmen foram avaliadas imediatamente após a coleta (FORDYCE et al., 2006). O volume foi mensurado e uma gota de sêmen avaliada por microscopia de contraste de fase, com placa aquecedora a 37 °C, quanto à motilidade massal e motilidade progressiva. A motilidade total (MOT) foi avaliada em ampliação de 400 x sob uma lâmina a pré-aquecida. Uma alíquota de 20 µL foi diluída em 0,2% de glutaraldeído em solução salina tamponada com fosfato para posterior análise da

morfologia espermática. Uma alíquota de 1 ml de sêmen, adicionada de 10 µL de inibidor de proteases (AEBSF 4-2-aminoethyl benzenesulfonyl fluoride, pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin and aprotinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), foi centrifugado a 700 g durante 15 minutos e o sobrenadante, congelado em nitrogênio líquido para posterior análise das proteínas do plasma seminal.

Eletroforese bidimensional em gel diferencial (DIGE)

As amostras do plasma seminal foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a $10.000 \times g$, por 60 minutos e 4°C. O plasma seminal foi aliquoteado e estocado a -80°C. De acordo com estratégia previamente descrita (MATIGIAN et al., 2010), um total de 200 µL de plasma seminal foi transferido para um novo micro tubo sendo as amostras precipitadas com *2D Cleanup Kit* (GE Healthcare, UK), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram ressuspensas em 50 mL tampão DIGE de lise (7 M ureia, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8.5). Determinou-se a concentração total de proteína através do *2-D Quant Kit* (GE Healthcare, UK).

A marcação das proteínas para o DIGE foi realizada com *CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) labeling kit* (GE Healthcare, UK), com algumas modificações: 22 µg de proteína de cada amostra coletada por VAI foram marcadas com 400 pmol de Cy3 em um volume final de 20 µL. Uma alíquota com 22 µg de proteína de cada amostra coletada por EEJ foi marcada com 400 pmol de Cy5. Inversamente ao passo anterior, as amostras coletadas por VAI foram marcadas com 400 pmol de Cy5 e amostras coletadas por EEJ, marcadas com 400 pmol de Cy3 (Figure 2). O controle interno consistiu em um *pool* de alíquotas contendo a mesma quantidade de proteína de cada amostra, marcado com Cy2 e utilizando a mesma taxa de 22 µg de proteína por 400 pmol de CyDye. Todas as marcações foram conduzidas em gelo e deixada em ambiente escuro por 30 minutos, seguida da adição de 10 mM lisina (1 µL) em gelo por 10 minutos. Cada amostra foi diluída em volumes iguais em tampão de amostra (7 M ureia, 2 M

tiourea, 4% CHAPS, 80 mM DTT, 2% *pharmalytes*). A combinação das amostras para compor cada gel foi definida com base no método de coleta de sêmen, onde as amostras marcadas com Cy3 (VAI) e Cy5 (EEJ), ou vice versa, foram agrupadas juntamente com a alíquota marcada como controle interno (Figura 2).

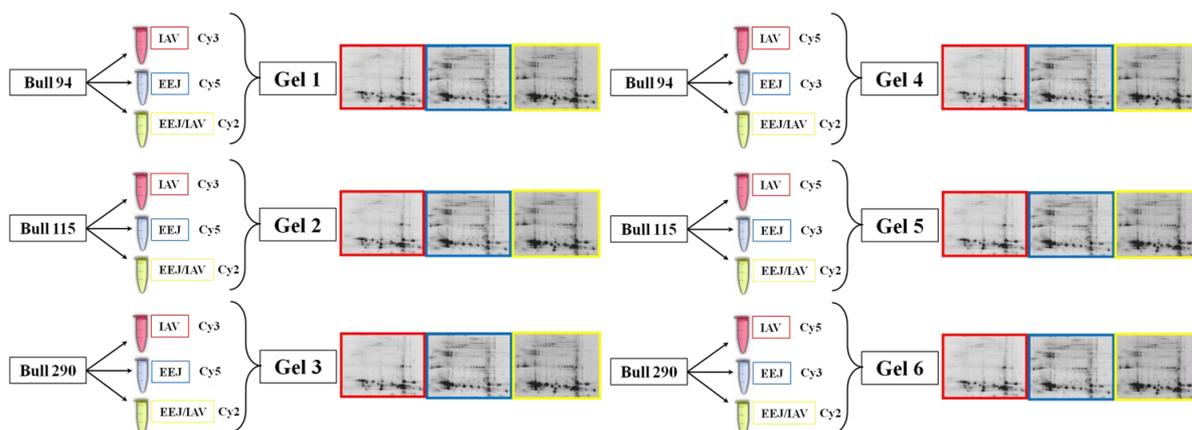


Figura 2. Marcação e pareamento das proteínas do plasma seminal provenientes de amostras de sêmen coletadas por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ). Para o sistema 2D DIGE, o padrão interno consistiu de um *pool* de 22 μ g de cada uma das amostras (VAI e EEJ) marcado com Cy2. As amostras individuais em cada grupo (VAI e EEJ) foram marcadas com Cy3 e Cy5.

Para condução do processo de eletroforese propriamente dito, as amostras de plasma seminal foram diluídas até um volume final de 450 μ L com tampão de reidratação (7 M ureia, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 40 mM DTT, 1% *pharmalytes*), aplicadas na bandeja de hidratação e incubadas com tiras de 24 cm *IPG (immobilized pH gradient, pH 3 to 11, linear; GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA)* por 20 h em temperatura ambiente. Adicionado à tira, óleo mineral (1,5 to 3 mL) suficiente para cobrir totalmente as tiras em cada ranhura da bandeja de hidratação. A focalização isoelétrica foi conduzida em um equipamento Ettan™ IPGphor 2™ (GE Lifesciences, USA) a 20 °C com a seguinte programação: 100 V por 3 h, 250V por 3 h, 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 5000 V por 2 h em gradiente, 5000 V por 8 h (52.550 V totais,

aproximadamente), além de um passo adicional de 30 V para evitar a difusão proteica no final da focalização. Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio I durante 15 minutos (6 M ureia, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% v/v glicerol, 2% w/v SDS, 1% w/v DTT) e reequilibradas por mais 15 minutos com o tampão II (tampão de equilíbrio I contendo 2,5% w/v de iodoacetamida no lugar do DTT). Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram fixadas com agarose (5% em tampão de corrida) no topo do gel de poliacrilamida (15%) em uma cuba modelo *Caster Ettan DALT Twelve system* (Amersham Pharmacia Biotech, USA) acoplada a um tanque e corrida a 20°C, com 5 *watts*/gel por 45 minutos seguidos por 10 *watts*/gel por 8 h até o azul de bromofenol atingir a borda inferior do gel. Depois da segunda dimensão os géis foram escaneados com *Typhoon 9400 scanner* (Typhoon 9400, Variable Mode Manager Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, USA) usando configurações predefinidas para os marcadores *Cy2*, *Cy3* e *Cy5* a 200 μm . As imagens dos géis foram cortadas e analisadas através do aplicativo Progenesis SameSpots image-analysis versão 4.1 (Nonlinear Dynamics, USA). Os géis foram alinhados com os vetores gerados automaticamente e, em seguida, examinado manualmente para confirmar alinhamentos com vetores adicionados. As imagens foram agrupadas e comparadas em função dos métodos de coleta de sêmen (EEJ vs controle e VAI vs controle), utilizando para a comparação entre os métodos o volume dos *spots*, após terem sido testados quanto à normalidade.

Os dados referentes a parâmetros seminais e volume dos *spots* associados às coletadas por EEJ e VAI foram submetidos à análise de variância utilizando o Statview statistics Software (version 5.0, SAS Institute Inc. 2000), com as médias comparadas pelo teste T pareado, com significância de $\alpha= 0.05$. Os *spots* com volumes diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos (EEJ vs VAI) foram identificados por espectrometria de massas.

Coloração do gel com Coomassie blue G-250

Novos géis (n=3) foram preparados para a identificação dos *spots* diferencialmente expressos nos mapas 2D-DIGE das amostras coletadas por EEJ e VAI. Um total de 750 µg de proteína do plasma seminal das mesmas amostras avaliadas por 2D-DIGE foi separado utilizando eletroforese 2-D e os géis, corados com *Coomassie coloidal blue G-250*, adaptando um protocolo previamente descrito (CANDIANO et al., 2004; SOUZA et al., 2012). Em resumo, após a segunda dimensão, os géis foram lavados três vezes (20 minutos cada) com uma solução contendo ácido fosfórico (2%) e etanol (30%) em água, seguidos de mais três lavagens com ácido fosfórico (2%) em água. Os géis foram imersos por 72 h em solução com ácido fosfórico (2%), etanol (18%) e sulfato de amônio (15%), adicionados de 2 mL de solução de Coomassie G-250 (2% w/v).

Digestão trípica das proteínas e limpeza das amostras (Zip-tip clean up)

De três géis corados com *Coomassie blue G-250*, os *spots* foram cortados individualmente em pedaços de aproximadamente 1 mm³ e completamente descorados com 400 µL de solução contendo acetonitrila 50% (ACN)/bicarbonato de amônio (50% a 25 mM, pH 8,0) ficando nesta solução aproximadamente 16 horas. Os *spots* foram desidratados duas vezes com 200 µL de acetonitrila absoluta durante 5 minutos e secos à temperatura ambiente. As proteínas foram incubadas por, aproximadamente, 20 horas, a 37° C, com solução contendo tripsina (166 ng/spot; Promega, cat. # v5111, Madison, WI, USA), ácido acético 50 mM (solução estoque 200 ng/µL) e diluída com bicarbonato de amônio 50 mM. Os peptídeos foram extraídos com 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA), 50% de ACN em solução de bicarbonato de amônio (50 mM) por 30 minutos, sendo submetidos a três lavagens. Os extratos foram acondicionados em micro tubos (Eppendorf, USA) e concentrados a vácuo até o volume final de 10 µL. Um pedaço de gel sem *spots* e um *spot* referente a albumina proveniente do marcador molecular usado

na segunda dimensão foram submetidos ao mesmo procedimento e utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Após a extração dos peptídeos dos géis, as amostras foram limpas com uma ponteira C18 (Millipore Badfor, USA) (Nouwens et al., 2000). A ponteira foi umedecida com ACN 100% (3 x 10 µL), foi equilibrada com uma solução contendo 5% de ACN / 0,1% de TFA (3 x 10 µL) e logo após as amostras foram aspiradas (3 x aspiradas/eluidas). As ponteiras foram lavadas com solução contendo 5% de ACN / 0,1% de TFA (3 x 10 µL) logo depois as amostras foram eluidas com uma solução contendo 80% de ACN / 0,1 de TFA (10 µL) dentro de um novo tubo e diluída com água milliQ suficiente para um volume final de 100 µL (NOUWENS et al., 2000).

Identificação das proteínas utilizando espectrometria de massas (TripleToF-MS) e busca de dados

Os peptídeos foram separados utilizando cromatografia de fase reversa num sistema de Shimadzu Prominence nano LC, conforme descrito anteriormente (KAPPLER; NOUWENS, 2013b) com modificações. Usando um fluxo de 30 mL/min, as amostras foram desalinizadas numa coluna Agilent C18 (0,3 x 5 mm, 5 mm) durante 3 min, seguido por separação numa coluna Vydac Everest C18 (300 A, 5 µm, de 150 mm x 150 µm) a um de fluxo de 1 mL/min. Um gradiente de 10-60% de tampão B ao longo de 30 min, em tampão A que consistia em 1% de ACN/TFA a 0,1% e tampão B de 80% de ACN/0,1% de TFA foi utilizado para separar os peptídeos. Os peptídeos eluidos foram diretamente analisadas em um instrumento TripleTof 5600 (ABSciex , EUA) utilizando uma interface de Nanospray III. As configurações de gás e tensão foram ajustadas conforme a necessidade. A varredura do MS TOF de m/z 350-1800 foi realizada por 0,5 s, seguido por informações aquisição dependente de 20 peptídeos variando m/z 40-1800 (0,05 s por espectro). Os dados adquiridos foi convertido para formato genérico Mascot (MGF) usando o software v1.1 Peakview (ABSciex , EUA)

antes de realizar a pesquisa no banco de dados. Os arquivos foram buscados utilizando uma versão local do MASCOT contra SwissProt e NCBIInr usando como taxonomia , mamíferos, acessado através do Australian Proteomics Computational Facility (www.apcf.edu.au). Os parâmetros utilizados para a pesquisa incluíram a tripsina como enzima com o máximo de 1 clivagem perdida, a tolerância de erro de 50 ppm (MS) e 0,1 Da (MS/MS). Carbamidometilação da cisteína (fixo) e a oxidação de metionina foram usadas modificações (variável).

RESULTADOS

Parâmetros seminais

Os três touros selecionados para este estudo tinham em média 33 cm de circunferência escrotal com variações entre 32,5 a 33,5 cm. A média do volume seminal foi maior ($p < 0,05$) para amostras coletadas por EEJ ($4,3 \pm 0,4$ mL) quando comparadas com as amostras coletadas por VAI ($3,0 \pm 1,8$ mL). Em contrapartida, a média da concentração espermática foi maior ($p < 0,05$) em amostras coletadas por VAI ($1690 \pm 237 \times 10^6$ sperm/mL) do que em amostras coletadas por EEJ ($315 \pm 64 \times 10^6$ sperm/mL). As porcentagens de motilidade e morfologia espermática não diferiram estatisticamente entre os métodos de coleta de sêmen ($p > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros seminais (medias \pm EP) associadas a amostras de sêmen de touros *Bos indicus* coletados por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ). Os valores representam as medias de quatro coletas de sêmen realizadas no período de um mês. Em cada ocasião, a coleta por VAI foi seguida por EEJ, com 2,5 h de intervalo entre as duas coletas e, na coleta seguinte, o método foi alternado (EEJ seguido por VAI) e assim sucessivamente.

Parâmetros seminais	Método de coleta de sêmen		
	VAI	EEJ	p
Volume (mL)	3,0 \pm 1,81	4,3 \pm 0,42	0,000187
Concentração ($\times 10^6$ sperm/mL)	1690 \pm 237	315 \pm 64	0,000013
Motilidade (%)	70,0 \pm 0,03	60,0 \pm 0,10	0,113234
PEN (%)	84,6 \pm 2,80	88,8 \pm 1,85	0,274881

PEN: Porcentagem de espermatozoides normais.

Proteínas do plasma seminal

A concentração de proteína total no plasma seminal foi maior em amostras coletadas por VAI em comparação às coletadas por EEJ (19,3 \pm 0,9 vs. 13,0 \pm 1,8 mg/mL, $p < 0,05$; respectivamente). Em função da análise conduzida com o aplicativo *Progenesis SameSpots*, foram detectados no gel referência uma média de 235 \pm 18 spots. Este gel inclui proteínas no intervalo de pH de 3 a 11 e representa a combinação de amostras coletadas por VAI e EEJ (*pool*) marcado com Cy2 (Figura 3A). Com base na análise do aplicativo descrito acima, um total de 55 foram diferentemente expressos nas amostras coletadas por VAI vs EEJ. Destes, 22 spots tiveram maior volume ($p < 0,05$) em géis de amostras coletadas por VAI, correspondendo a 21 diferentes proteínas, as quais foram identificadas como *transferrin*, *albumin*, *metalloproteinase inhibitor 2*, *protein FAM3C*, isoformas das *binders of sperm protein 1 (BSP 1)* e *3 (BSP 3)*, *epididymal secretory glutathione peroxidase*, *spermadhesin-1*, *angiogenin-1*, *cathepsin S*, *glutathione S-transferase*, dentre outras (setas vermelhas na Figura 3A e caixas

vermelhas na Figura 3B; Tabela 2A). Em contrapartida, o volume de 33 *spots*, correspondendo a 26 diferentes proteínas, foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos géis das amostras coletadas por EEJ (setas pretas na Figura 3A e caixas verdes na Figura 3B, Tabela 2B). Estes *spots* foram identificados como *albumin*, *fibrinogen alpha chain*, *platelet-activating factor acetylhydrolase*, *seminal ribonuclease*, *spermadhesin-1*, isoformas das *BSP 1, 3 e 5*, *angiogenin-1*, *polymeric immunoglobulin receptor*, *72 kDa type IV collagenase*, *alpha-1B-glycoprotein*, *T-complex protein 1 subunit theta*, *carboxypeptidase Q*, *phosphoglycerate kinase 2*, *L-lactate dehydrogenase C chain*, *clusterin*, *nucleobindin-1*, *cathepsin L1*, *fibrinogen beta chain*, *complement factor B*, *spermadhesin Z13*, *annexin A1*, *annexin A5* and *transferrin*. As diferenças entre os volumes dos *spots* em cada método de coleta de sêmen estão mostradas nas Figuras 4A e 4B.

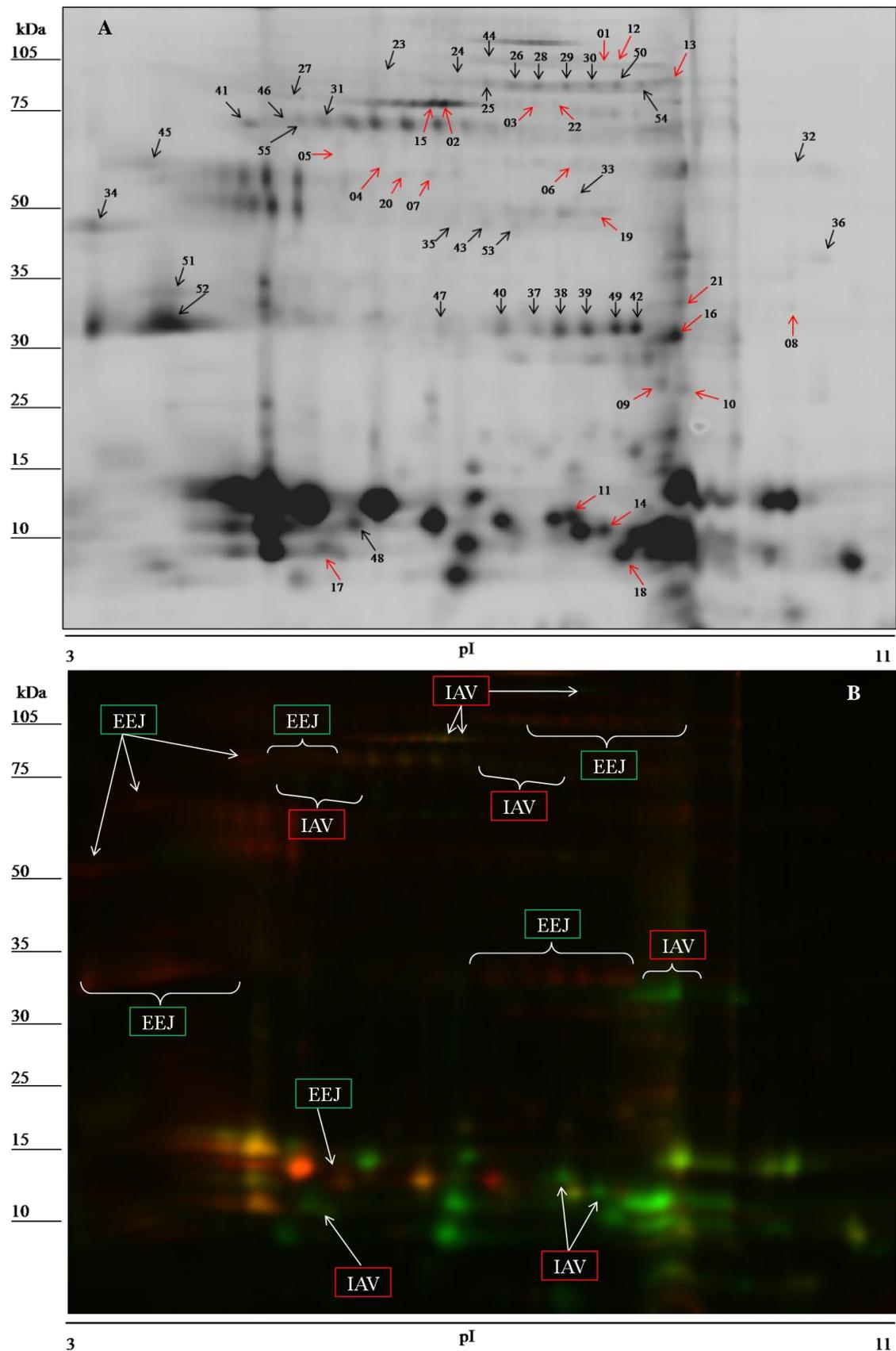


Figura 3. Perfil proteômico do plasma seminal de touros *Bos indicus* coletados por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ). (A) A imagem representa o controle interno constituído por uma mistura de amostras de plasma seminal proveniente de ambos os métodos de coleta marcados com Cy2. (B) Representa a imagem do gel (2D-DIGE) com os principais *spots* diferentemente expressos ($p < 0,05$) nas amostras coletadas por VAI e EEJ.

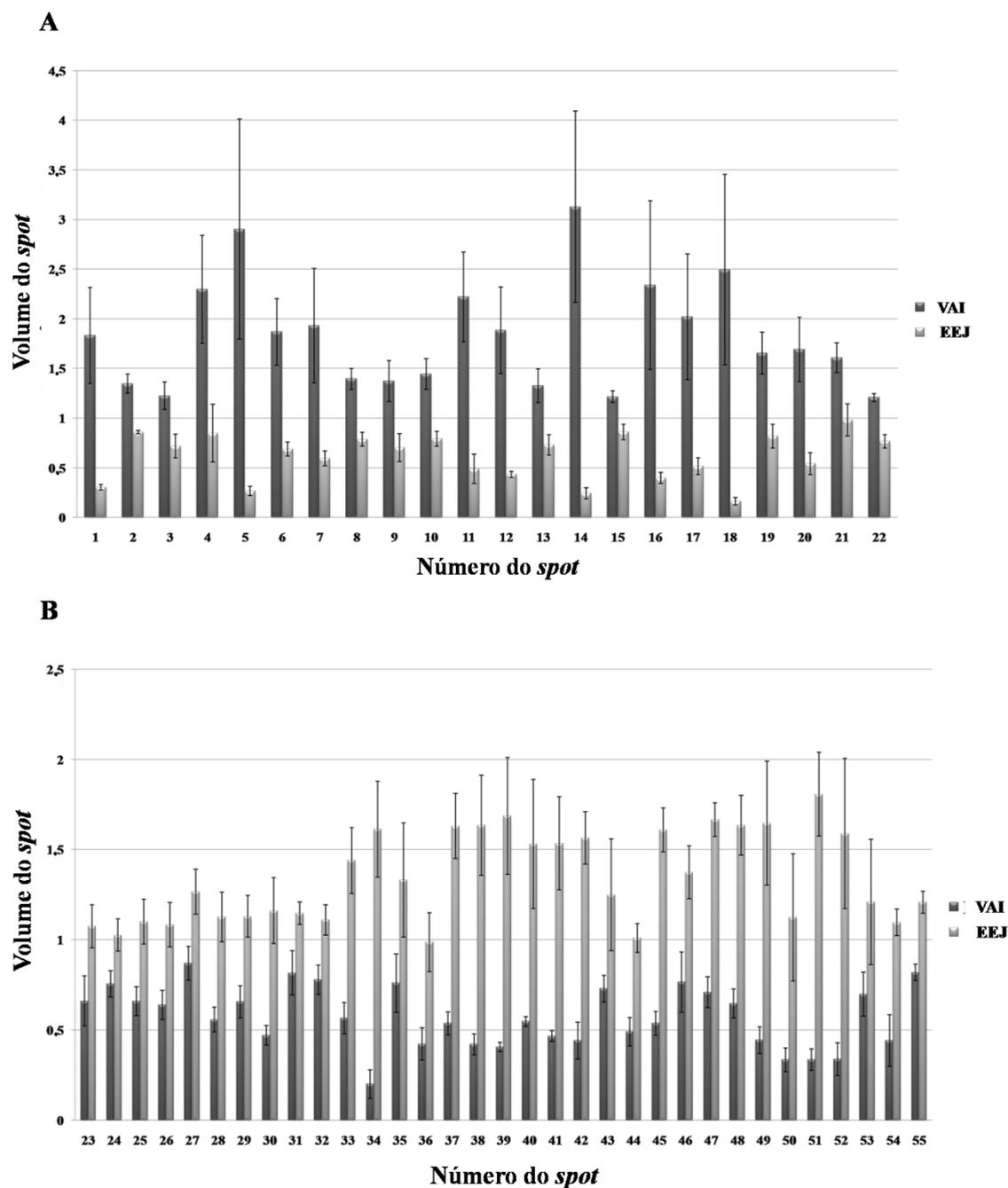


Figura 4. *Spots* diferencialmente ($p < 0,05$) expressos no plasma seminal de touros *Bos indicus* (médias \pm EP) coletados por vagina artificial interna (VAI) e eletroejaculação (EEJ). (A) Representa *spots* significativamente mais expressos no plasma seminal de amostras coletadas por VAI (volume do *spot* \pm EP) comparado com EEJ. (B) Representa *spots* significativamente mais expressos no plasma seminal de amostras coletadas por EEJ (volume do *spot* \pm EP) comparado com VAI. Os números dos *spots* se referem aos mostrados na figura Figura 3A e Tabela 2.

DISCUSSÃO

Os dados apresentados no estudo demonstram, pela primeira vez, que o perfil proteico do plasma seminal de touros *Bos indicus* é significativamente afetado pelo método de coleta de sêmen. No presente estudo, utilizou-se uma associação de abordagens proteômicas como eletroforese bidimensional em gel diferencial e espectrometria de massas (*TripleToF-MS*) para identificar proteínas diferentemente expressas no plasma seminal de touros da raça Brahman submetidos a dois métodos de coleta de sêmen. A eletroejaculação constitui um dos métodos de coleta de sêmen mais utilizados em centrais de inseminação por ser um método seguro e eficiente (HILL et al., 1956; BARTH et al., 2004). Enquanto que a EEJ é utilizada há mais de 90 anos (BATELLI, 1922; DZIUK et al., 1954), o emprego da coleta por vagina artificial interna foi desenvolvido há menos de 10 anos (PALMER, 2005; CRUZ et al., 2011), sendo este considerado um método de coleta de sêmen que mais se aproxima do natural.

A motilidade e porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais não foram influenciados pelo método de coleta, porém detectou-se reduzida concentração espermática associada a um elevado volume do ejaculado nas amostras coletadas por EEJ em comparação com aquelas obtidas por VAI. Resultados similares foram descritos quando se compararam amostras de sêmen de touros coletadas por EEJ e vagina artificial convencional (PARVANOV, 2000) ou ainda comparando-se o método de EEJ com VAI (PARVANOV, 2000; BARTH et al., 2004). No presente estudo, houve redução de 32,6% na concentração total de proteína em amostras de plasma seminal coletadas por EEJ. O mecanismo fisiológico associado a este efeito ainda não está completamente compreendido mas tal efeito pode ser consequência do estímulo elétrico aplicado às glândulas sexuais acessórias durante a coleta por EEJ. Este estímulo potencialmente induziria uma grande secreção de fluido por estas glândulas, causando diluição do total de proteínas do plasma seminal e redução da concentração de espermatozoides no sêmen. Estudos demonstram que o sêmen obtido por estimulação

elétrica de homens com lesões graves na medula espinhal apresenta modificações na secreção de fluidos e proteínas do plasma seminal em comparação com o sêmen de indivíduos normais (SONKSEN; OHL, 2002; DA SILVA et al., 2013), demonstrando haver uma relação entre a inervação das glândulas sexuais acessórias, a sua capacidade de responder aos estímulos elétricos deflagrados durante a coleta de sêmen por EEJ e a secreção de proteínas neste fluido.

Proteínas diferencialmente expressas nos mapas bidimensionais do plasma seminal de amostras coletadas por vagina artificial interna

As principais proteínas expressas no plasma seminal de amostras coletadas por VAI foram identificadas como *albumin* (sete *spots* com maior volume expressos em VAI vs. 1 *spot* expresso em maior volume em EEJ) seguido pela *serotransferrin* (seis *spots* com maior volume expressos em VAI vs. 1 *spot* expresso em maior volume em EEJ). A *albumin* constitui um dos principais componentes proteicos do fluido da cauda do epidídimo de bovinos (MOURA et al., 2010) sendo também identificada, em menor quantidade, no fluido das glândulas sexuais acessórias de *Bos taurus* (MOURA et al., 2007b). A *albumin* possui a capacidade de modular o efluxo de colesterol da membrana espermática (GO; WOLF, 1985; MOURA et al., 2007a), associada com a atividade de fosfolipase, sugerindo uma atuação em eventos ligados à capacitação espermática (VISCANTI; KOPF, 1998) e reação acrossômica (SINGLETON; KILLIAN, 1983). Além disso, a *albumin* pode atuar inibindo a dismutação de ânions superóxidos o que resulta em um decréscimo de peróxido de hidrogênio, o qual é tóxico para as células espermáticas (BELL et al., 1992; ARMSTRONG et al., 1998). Esta proteína ainda atua na absorção de peróxidos lipídicos e, portanto, como fator de proteção para a membrana espermática e manutenção da motilidade (ALVAREZ; STOREY, 1995; MOURA et al., 2007a).

Em touros, a *serotransferrin* é secretada no plasma seminal (GILMONT et al., 1990) e parece ser originada principalmente do fluido da cauda do epidídimo (MOURA et al., 2010). A *serotransferrin* integra o arsenal proteico presente no plasma seminal capaz de proteger os espermatozoides contra o estresse oxidativo por interagir com o ferro livre, prevenindo peroxidação lipídica (WAKABAYASHI et al., 1999). A *transferrin* presente no plasma seminal tem sido positivamente correlacionada com a motilidade e com a concentração espermática em humanos (BHARSHANKAR; BHARSHANKAR, 2000), equinos (KIKUCHI et al., 2003) e touros (GILMONT et al., 1990). No presente estudo, a motilidade espermática não foi influenciada pelo método de coleta, porém tanto a concentração espermática quanto a presença de proteínas secretadas majoritariamente no epidídimo dos touros, como a *albumin* e a *transferrin*, foram maiores em amostras coletadas através do método da vagina artificial interna.

Proteínas como a *seminal ribonuclease* and *fibrinogen alpha chain* tiveram maior expressão em *spots* dos mapas de amostras coletadas por VAI (dois *spots* com maior volume em amostras da VAI vs. 1 *spot* com maior volume em amostras da EEJ). A *seminal ribonuclease* possui atividade antitumoral (D'ERRICO et al., 2011) e funções imunossupressoras (SOUCEK et al., 1996; DYER; ROSENBERG, 2006), atuando como fator de proteção do espermatozoide durante o trânsito no trato reprodutivo da fêmea (MATOUSEK; KLAUDY, 1998). A *fibrinogen alpha chain*, por sua vez, é uma glicoproteína encontrada no fluido epididimário de bovinos e possui função ligada à proteção do espermatozoide contra degradação proteolítica, além de regular a capacitação como um fator antiaglutinante (PARK et al., 1997; REYES-MORENO et al., 2002). A *epididymal secretory glutathione peroxidase*, *glutathione S-transferase P*, *cathelicidins*, *protein FAM3C*, *cathepsin S*, *alpha-2-macroglobulin*, e *inhibitor of carbonic anhydrase* são típicas e conhecidas proteínas de origem epididimária (IGDOURA et al., 1995; KAUNISTO et al., 1995; MALM et al., 2000; BELLEANNEE et al., 2011) foram identificadas em *spots* expressos em maior volume nos géis 2-DIGE

de amostras coletadas por VAI. A *epididymal glutathione peroxidase* e a *glutathione S-transferase P* constituem importante sistema para proteção dos espermatozoides contra a ação das espécies reativas de oxigênio geradas pelo próprio metabolismo espermático durante o trânsito epididimário e armazenamento na cauda deste órgão (RAIJMAKERS et al., 2003; KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011). A *cathelicidin* pertence a família dos peptídeos com propriedades antimicrobianas expressos no epitélio do epidídimo e age protegendo as células espermáticas contra o ataque do sistema imunológico feminino após a ejaculação (MALM et al., 2000; ANDERSSON et al., 2002). No caso da *protein FAM3C*, trata-se de uma proteína envolvida na resistência de bactérias a presença de metais, especialmente o cobre (FONG et al., 1995). O cobre é essencial para reações de redução em diversos processos biológicos porém, quando em excesso, pode causar danos celulares (ARNESANO et al., 2003), fato que sugere uma possível função da *protein FAM3C* na regulação das concentrações de cobre e consequente manutenção da integridade dos espermatozoides. As *serine proteinases*, como a *cathepsin S*, têm sido descritas como componentes do fluido do epidídimo de humanos (INAYAT et al., 2012) e estão envolvidas nos processos de degradação proteica e ativação enzimática durante a maturação espermática (VAZQUEZ-ORTIZ et al., 2005). A *alpha-2-macroglobulin*, por sua vez, é um inibidor de protease não específico com potenciais interações com as *cathepsins*, atuando como modulador da atividade destas proteínas no epidídimo (PELOILLE et al., 1997a). Assim, as proteinases cisteínicas e seus inibidores compõem um sistema que desempenha importante papel no remodelamento da membrana espermática durante o trânsito epididimário (TOMOMASA et al., 1994; IGDOURA et al., 1995). A presença de proteínas majoritariamente de origem epididimária com maior expressão em amostras coletadas por VAI reforça a teoria de que o tipo de estímulo que leva à ejaculação influencia o perfil proteico dos fluidos das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo e, conseqüentemente, a composição proteica do plasma seminal.

Fisiologicamente, o sêmen contém células espermáticas e fluidos provenientes prioritariamente do epidídimo e glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2007b). No presente estudo, reporta-se que uma enzima celular, *phosphoglycerate mutase 2*, uma proteína de origem testicular como a *angiogenin-1* e proteínas encontradas no plasma seminal como a *ephrin A1* e a *CutA* foram identificadas em *spots* com maior volume nos géis de amostras coletadas por VAI. A *phosphoglycerate mutase 2* está associada à produção de ATP pelo espermatozoide (FUNDELE; KRIETSCH, 1985; FUNDELE et al., 1987) e participação na via glicolítica e fosforilação oxidativa na mitocôndria, processos necessários à manutenção da motilidade espermática e batimento flagelar (ZHAO et al., 2007). Por sua vez, a *ephrin A1* e a *protein CutA* possuem funções ligadas à sinalização celular (PERRIER et al., 2000; COULTHARD et al., 2012) funcionando como âncoras para a *acetylcholinesterase* nas superfícies das células cerebrais de mamíferos (NAVARATNAM et al., 2000; PERRIER et al., 2000). A presença de *acetylcholinesterase* no plasma seminal está diretamente associada a aumentos na motilidade espermática em humanos (MOR et al., 2008), fato este que sugere um envolvimento da *protein CutA* em eventos ligados à função espermática. Em estudo prévio sobre a congelabilidade do sêmen de caprinos, amostras de sêmen provenientes de coletas realizadas com vagina artificial apresentaram maior motilidade espermática quando comparadas com amostras coletadas por EEJ (JIMENEZ-RABADAN et al., 2012). No presente estudo, não se detectou efeito significativo do método de coleta do sêmen sobre a motilidade espermática dos touros mas é importante observar que as avaliações realizadas com amostras de sêmen fresco podem não refletir os mesmos resultados encontrados para amostras de sêmen congelado e descongelado, as quais possivelmente sofreram alterações causadas pelo estresse da criopreservação. A proteína *ephrin A1* está envolvida na sinalização celular durante processos inflamatórios (COULTHARD et al., 2012), durante a implantação trofoblástica e na interação celular com o epitélio uterino em suínos (FUJIWARA et al., 2002; FU et al., 2012) e humanos

(RED-HORSE et al., 2005). No entanto, o papel das *ephrins* na fisiologia do macho e função espermática ainda permanece desconhecido.

Proteínas diferencialmente expressas nos mapas bidimensionais do plasma seminal de amostras coletadas por eletroejaculação

Embora a concentração de proteína total tenha sido inferior nas amostras coletadas por EEJ, detectou-se 33 *spots* com maior volume nos mapas bidimensionais destas amostras, correspondendo a 26 proteínas diferentes. Algumas destas proteínas, como a *metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP-2)*, *BSPs*, *annexins* e *spermadhesins*, são proteínas tipicamente secretadas no fluido das glândulas sexuais acessórias (IGNOTZ et al., 2007; MOURA et al., 2007a; MOURA et al., 2007b). As *spermadhesins* podem ser detectadas no fluido da cauda do epidídimo de touros também (MOURA et al., 2010) porém em reduzida quantidade quando comparada com a expressão no fluido das glândulas sexuais acessórias de touros (MOURA et al., 2007b). A *metalloproteinase inhibitor 2* foi identificada em amostras coletadas por ambos os métodos, porém com maior presença de *spots* em amostras coletadas por EEJ (oito *spots* em EEJ vs. quatro *spots* em VAI). A *TIMP-2* é uma reguladora da proteína *matrix metalloproteinase 2*, a qual integra um sistema proteolítico envolvido na reação acrossômica e interação entre gametas (DIAZ-PEREZ; MEIZEL, 1992; MCCAULEY et al., 2001).

Considerando todos os *spots* identificados como *BSPs*, a maior expressão em volume de *spots* foi prevalente nos mapas de amostras coletadas por EEJ (cinco *spots* com maior volume em EEJ vs quatro *spots* em VAI). Os volumes de dois *spots* referentes à *BSP 5* foi maior em amostras coletadas por EEJ e nenhum *spot* identificado como *BSP 5* foi encontrado com maior expressão em amostras coletadas por VAI. As *BSPs* ligam-se à membrana espermática após a ejaculação através dos fosfolipídios e promovem o efluxo de colesterol (MANJUNATH; SAIRAM, 1987; MOURA et al., 2007b), evento essencial para a capacitação espermática. As *BSPs* também podem

mediar a interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto para formar o reservatório espermático no trato reprodutivo feminino (GWATHMEY et al., 2006). Em estudo conduzido em carneiros, não foram encontradas diferenças na concentração de proteínas totais no plasma seminal em amostras coletadas por EEJ e por vagina artificial convencional (MARCO-JIMENEZ et al., 2008). Porém, dois *spots* apareceram em maior abundância nos mapas bidimensionais de plasma seminal coletado por EEJ. Embora não tenham sido identificados, sugere-se presentemente que estes *spots* sejam homólogos das *BSPs* em função principalmente da localização dos mesmos nos géis bidimensionais (valores de peso molecular e pI) e em estudo prévio sobre o proteoma do plasma seminal de carneiros (SOUZA et al., 2012). Nos touros Brahman, duas isoformas de *annexins* foram expressas em maior quantidade em amostras coletadas por EEJ. Em humanos, *annexins* são secretadas pela próstata (CHRISTMAS et al., 1991) e é possível que estes componentes tenham a mesma origem em touros. De forma similar às *BSPs*, as *annexins* bovinas ligam-se à membrana espermática e mediam a interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto contribuindo com a formação do reservatório espermático no oviduto (IGNOTZ et al., 2007). As *spermadhesins* são proteínas secretadas principalmente pelas glândulas sexuais acessórias, mas também presentes no fluido da cauda do epidídimo de touros (MOURA et al., 2007b; MOURA et al., 2011), fato que pode explicar a detecção de apenas um *spot* desta proteína em maior volume em amostras coletadas por VAI vs dois *spots* detectados com maior volume em amostras obtidas por EEJ. As *spermadhesins* são proteínas multifuncionais que interagem com fosfolipídios e glicoproteínas da membrana espermática e supostamente participam da interação entre espermatozoide e zona pelúcida (SANZ et al., 1992; SOLIS et al., 1998). Portanto, evidencia-se, no presente estudo, que a secreção de isoformas das *BSPs* e *spermadhesins*, típicos e principais componentes do fluido das glândulas sexuais acessórias de touros (MOURA et al., 2007b), pode ser influenciada pelo método de coleta de sêmen.

Outras proteínas identificadas em *spots* com maiores volumes nos mapas bidimensionais de amostras coletadas por EEJ incluem *cathepsin L1*, *nucleobindin*, *clusterin*, *T-complex protein 1 subunit theta* e *complement factor B*, e *alpha-1B-glycoprotein*. A *cathepsin L1* é uma protease cisteínica identificada como um dos principais componentes da vesícula seminal de humanos (INAYAT et al., 2012). Após a ejaculação, as *cathepsins* interagem com os espermatozoides e são possivelmente associadas com a penetração do espermatozoide na barreira formada pelas células do cumulus e da zona pelúcida (MOURA et al., 2007b). A *nucleobinding-1* está envolvida em eventos ligados à sinalização celular e interação célula-célula (VALENCIA et al., 2008; KONCZOL et al., 2010), conectando-se com a matriz extracelular (PETERSSON et al., 2004), o que sugere a sua participação no processo de fertilização. A *clusterin*, *T-complex protein 1 subunit theta* e *complement factor B* agem como chaperonas (ROMMELAERE et al., 1993; STERNLICHT et al., 1993), protegendo as células contra os efeitos deletérios da precipitação proteica e as ações do sistema complemento. A *alpha-1B-glycoprotein*, é uma proteína com atividade anti-inflamatória, pertencente à família das imunocalinas, e está presente nas células epiteliais da próstata de humanos e no plasma seminal (PANIDIS et al., 1993; FOURNIER et al., 2000). Esta proteína desempenha papel na modulação da atividade do sistema imune durante as reações de fase aguda, sugerindo um efeito anti-inflamatório (LOGDBERG; WESTER, 2000; KRATZ et al., 2003). Em touros de raças de corte, o uso de EEJ tem sido associado a aumento das concentrações de cortisol (WHITLOCK et al., 2012). Desta forma, a identificação de um fator anti-inflamatório no plasma seminal de animais submetidos à EEJ pode ser resultado de uma resposta fisiológica ao estresse causado pelo estímulo elétrico. A *nucleobindin* e a *clusterin* são secretadas tanto no epidídimo quanto nas glândulas sexuais acessórias em touros, porém a *cathepsin L1*, *complement factor B* e *alpha-1B-glycoprotein* são componentes originados das glândulas sexuais acessórias.

Proteínas associadas à membrana celular e componentes intracelulares foram também identificadas em *spots* com maior volume nas amostras obtidas por EEJ. O *Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase* está presente no espermatozoide de touros (HOUGH; PARKS, 1994) e sua principal função está ligada à estabilização dos fosfolípidios da membrana (JARVI et al., 1993). O *polymeric immunoglobulin receptor* (*pIgR*) é uma proteína integral de membrana e precursor da *secretory immunoglobulin A* (MOSTOV et al., 1984), além de ser expresso em células epiteliais (KAETZEL, 2013). O *pIgR* tem sido detectado na próstata de humanos e participa da translocação de *immunoglobulin A* no trato genital masculino (SIRIGU et al., 1995; CUNNINGHAM et al., 2008) e está potencialmente envolvido em mecanismos para manter a integridade do trato reprodutivo atuando contra agentes infecciosos. A *carboxypeptidase Q* pertence à família das *serine proteases* encontradas na membrana celular e participa da hidrólise de peptídeos nos fluidos do organismo (SKIDGEL et al., 1984). As *carboxypeptidases* estão presentes no plasma seminal de humanos (MARQUINEZ et al., 2003) e são responsáveis por regular a clivagem peptídica na superfície celular e podem estar envolvidas no processo de endocitose celular (SKIDGEL; ERDOS, 1998). *Phosphoglycerate kinase 2* e *L-lactate dehydrogenase* são enzimas intracelulares que catalisam reações para a formação de ATP durante a glicólise (DANSHINA et al., 2010) e são relacionados com a atividade mitocondrial (TSUJII et al., 2002). A presença de proteínas de origem intracelular com maior expressão em amostras de plasma seminal obtido por EEJ pode indicar que houve maior lise celular devido a este método de coleta de sêmen mas experimentos subsequentes são ainda necessários para a confirmação desta hipótese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo identificou significativas diferenças no perfil proteico do plasma seminal de touros *Bos indicus* submetidos à coleta de sêmen por vagina artificial interna e eletroejaculação. As proteínas com maior expressão em amostras provenientes da VAI são, de acordo com a literatura, prioritariamente de origem epididimária e ligadas à função de proteção dos espermatozoides contra o estresse oxidativo, proteólise e microrganismos. Em contraste, o plasma seminal obtido por eletroejaculação foi, majoritariamente, caracterizado por expressão de proteínas das glândulas sexuais acessórias e com a presença de proteínas de origem intracelular. Portanto, dado que diversos atributos e função dos espermatozoides são modulados pelas proteínas do plasma seminal, o método de coleta precisa ser considerado quando o sêmen for coletado para uso em tecnologias de reprodução assistida. Levando em consideração que a eletroejaculação é comumente utilizada em centrais de coleta e processamento de sêmen, mais estudos são necessários para determinar se diluentes empregados no processo de criopreservação precisam ser modificados em função das mudanças ocorridas no perfil proteico do plasma seminal.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty-acids into and peroxidative loss of fatty-acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 42, n. 3, p. 334-346, Nov 1995.
- ANDERSSON, E. et al. Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 17, n. 10, p. 2529-34, Oct 2002.
- ARMSTRONG, J. S. et al. Antioxidant potential of human serum albumin: Role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, v. 19, n. 4, p. 412-419, Jul-Aug 1998.
- ARNESANO, F. et al. The evolutionarily conserved trimeric structure of CutA1 proteins suggests a role in signal transduction. *J Biol Chem*, v. 278, n. 46, p. 45999-6006, Nov 14 2003.
- AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHREE, R. L. Comparison of quality of bull semen collected in artificial vagina and by electroejaculation. *Journal of Dairy Science*, v. 44, n. 12, p. 2292-&, 1961 1961.
- BARTH, A. D. et al. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. *Anim Reprod Sci*, v. 84, n. 3-4, p. 315-325, Sep 2004.

- BATELLI, F. Une Methode pour obtenir Emission Complète du Liquide des Vesicules Seminales chez le Cobaye. *Physique et d' Hist. nat. de Geneve, Comp. Rend.*, p. 39:73, 1922.
- BELL, M. et al. Time course of hydrogen peroxide induced changes in the lipid peroxidation of human sperm membranes. *Advances in contraceptive delivery systems : CDS*, v. 8, n. 1-2, p. 144-50, 1992.
- BELLEANNÉE, C. et al. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *Journal of proteomics*, v. 74, n. 1, p. 59-78, Jan 1 2011.
- BHARSHANKAR, R. N.; BHARSHANKAR, J. R. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian journal of physiology and pharmacology*, v. 44, n. 4, p. 456-60, Oct 2000.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, May 2004.
- COULTHARD, M. G. et al. Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. *The American journal of pathology*, v. 181, n. 5, p. 1493-503, Nov 2012.
- CRUZ, F. B. et al. Internal artificial vagina (VAI) to assess breeding behavior of young *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci*, v. 126, n. 3-4, p. 157-61, Jul 2011.
- CUNNINGHAM, K. A. et al. Poly-immunoglobulin receptor-mediated transport of IgA into the male genital tract is important for clearance of *Chlamydia muridarum* infection. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, v. 60, n. 5, p. 405-14, Nov 2008.
- D'ERRICO, G. et al. Enforcing the positive charge of N-termini enhances membrane interaction and antitumor activity of bovine seminal ribonuclease. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1808, n. 12, p. 3007-15, Dec 2011.
- DA SILVA, B. F. et al. Differential seminal plasma proteome according to semen retrieval in men with spinal cord injury. *Fertility and Sterility*, Jul 10 2013.
- DANSHINA, P. V. et al. Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice. *Biology of reproduction*, v. 82, n. 1, p. 136-145, Jan 2010.
- DIAZ-PEREZ, E.; MEIZEL, S. Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. *Molecular Reproduction and Development*, v. 31, n. 2, p. 122-30, Feb 1992.
- DYER, K. D.; ROSENBERG, H. F. The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense. *Molecular diversity*, v. 10, n. 4, p. 585-97, Nov 2006.
- DZIUK, P. J.; GRAHAM, E. F.; PETERSEN, W. E. The technique of electroejaculation and its use in dairy bulls. *Journal of Dairy Science*, v. 37, n. 9, p. 1035-1041, 1954 1954.
- FONG, S. T.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T. O. MOLECULAR-GENETICS OF A CHROMOSOMAL LOCUS INVOLVED IN COPPER TOLERANCE IN *ESCHERICHIA-COLI* K-12. *Molecular Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 1127-1137, Mar 1995.
- FORDYCE, G. et al. Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia. *Theriogenology*, v. 66, n. 5, p. 1140-1148, Sep 15 2006.
- FOURNIER, T.; MEDJOUBI, N. N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1482, n. 1-2, p. 157-71, Oct 18 2000.
- FU, Y. et al. Expression of Eph A molecules during swine embryo implantation. *Molecular biology reports*, v. 39, n. 3, p. 2179-85, Mar 2012.
- FUJIWARA, H. et al. Human endometrial epithelial cells express ephrin A1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 87, n. 12, p. 5801-7, Dec 2002.

FUNDELE, R.; KRIETSCH, W. K. Purification and properties of the phosphoglycerate mutase isozymes from the mouse. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, v. 81, n. 4, p. 965-8, 1985.

FUNDELE, R. et al. Developmental activation of phosphoglycerate mutase-2 in the testis of the mouse. *Developmental Biology*, v. 124, n. 2, p. 562-6, Dec 1987.

GILMONT, R. R. et al. Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. *Biology of reproduction*, v. 43, n. 1, p. 151-7, Jul 1990.

GO, K. J.; WOLF, D. P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biology of reproduction*, v. 32, n. 1, p. 145-153, 1985 1985.

GWATHMEY, T. M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of reproduction*, v. 75, n. 4, p. 501-7, Oct 2006.

HILL, H. J. et al. Electroejaculation in the bull. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 128, n. 8, p. 375-80, Apr 15 1956.

HOUGH, S. R.; PARKS, J. E. Platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster. *Biology of reproduction*, v. 50, n. 4, p. 912-916, Apr 1994.

IGDOURA, S. A.; MORALES, C. R.; HERMO, L. Differential expression of cathepsin-B and cathepsin-D in testis and epididymis of adult rats. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 43, n. 5, p. 545-557, May 1995.

IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biology of reproduction*, v. 77, n. 6, p. 906-13, Dec 2007.

INAYAT, S. et al. High levels of cathepsins B, L and S in human seminal plasma and their association with prostasomes. *Andrologia*, v. 44, n. 6, p. 423-7, Dec 2012.

JARVI, K. et al. Platelet-activating-factor acetylhydrolase in the male reproductive-tract - origin and properties. *International journal of andrology*, v. 16, n. 2, p. 121-127, Apr 1993.

JIMENEZ-RABADAN, P. et al. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtiberica buck ejaculates. *Anim Reprod Sci*, v. 132, n. 1-2, p. 88-95, May 2012.

KAETZEL, C. S. *The Polymeric Immunoglobulin Receptor*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2013.

KAPPLER, U.; NOUWENS, A. S. The molybdoproteome of *Starkeya novella* - insights into the diversity and functions of molybdenum containing proteins in response to changing growth conditions. *Metallomics : integrated biometal science*, Jan 11 2013.

KAUNISTO, K. et al. Expression of carbonic anhydrase isoenzymes IV and II in rat epididymal duct. *Biology of reproduction*, v. 52, n. 6, p. 1350-7, Jun 1995.

KELLY, V. C. et al. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics*, v. 6, n. 21, p. 5826-33, Nov 2006.

KIKUCHI, M. et al. Relationship between seminal plasma lactoferrin and gonadal function in horses. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, v. 65, n. 11, p. 1273-4, Nov 2003.

KONCZOL, K. et al. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochemistry international*, v. 57, n. 3, p. 189-97, Oct 2010.

KOZIOROWSKA-GILUN, M. et al. Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 46, n. 3, p. 527-33, Jun 2011.

KRATZ, E. et al. Alterations of branching and differential expression of sialic acid on alpha-1-acid glycoprotein in human seminal plasma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 331, n. 1-2, p. 87-95, May 2003.

KRAUS, M. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *Journal of reproductive immunology*, v. 65, n. 1, p. 33-46, Feb 2005.

LEON, H. et al. Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. *Theriogenology*, v. 36, n. 3, p. 349-55, Sep 1991.

LOGDBERG, L.; WESTER, L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1482, n. 1-2, p. 284-97, Oct 18 2000.

MALM, J. et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infection and immunity*, v. 68, n. 7, p. 4297-302, Jul 2000.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical-characterization of 3 major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochemical Journal*, v. 241, n. 3, p. 685-692, Feb 1 1987.

MARCO-JIMENEZ, F.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 43, n. 4, p. 403-8, Aug 2008.

MARQUINEZ, A. C. et al. Identification of gp17 glycoprotein and characterization of prostatic acid phosphatase (PAP) and carboxypeptidase E (CPE) fragments in a human seminal plasma fraction interacting with concanavalin A. *Journal of protein chemistry*, v. 22, n. 5, p. 423-9, Jul 2003.

MATIGIAN, N. et al. Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Disease models & mechanisms*, v. 3, n. 11-12, p. 785-98, Nov-Dec 2010.

MATOUSEK, J.; KLAUDY, J. Qualitative and quantitative analyses of seminal ribonuclease in reproductive tract fluids of bulls. *Anim Reprod Sci*, v. 51, n. 2, p. 111-118, Apr 30 1998.

MCCAULEY, T. C. et al. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, n. 3, p. 336-341, Mar 2001.

MOR, I. et al. Acetylcholinesterase-R increases germ cell apoptosis but enhances sperm motility. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 12, n. 2, p. 479-95, Apr 2008.

MOSTOV, K. E.; FRIEDLANDER, M.; BLOBEL, G. The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature*, v. 308, n. 5954, p. 37-43, Mar 1-7 1984.

MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. *Animal Reproduction*, v. 2, n. 1, p. 3-10, Jan-Mar 2005.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, n. 2, p. 214-222, Feb 2007.

MOURA, A. A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci*, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, Apr 2007.

MOURA, A. A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *Journal of Andrology*, v. 27, n. 2, p. 201-211, Mar-Apr 2006.

MOURA, A. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *Journal of proteomics*, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, Sep 10 2010.

- NAVARATNAM, D. S. et al. Hydrophobic protein that copurifies with human brain acetylcholinesterase: amino acid sequence, genomic organization, and chromosomal localization. *Journal of neurochemistry*, v. 74, n. 5, p. 2146-53, May 2000.
- NOUWENS, A. S. et al. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis*, v. 21, n. 17, p. 3797-809, Nov 2000.
- PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, v. 64, n. 3, p. 469-79, Aug 2005.
- PANIDIS, D. et al. Orosomucoid levels in the seminal plasma of fertile and infertile men. *Archives of andrology*, v. 30, n. 3, p. 161-4, May-Jun 1993.
- PARK, J. Y. et al. Fibrinogen-like substance and thrombin-like enzyme in seminal plasma: coagulation system of human semen. *Archives of andrology*, v. 38, n. 1, p. 29-36, Jan-Feb 1997.
- PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, v. 168, n. 3, p. 215-29, Nov 2004.
- PARVANOV, P. Study on the effect of method of bull semen collection upon several qualitative parameters of fresh and after thawing of semen. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v. 6, n. 2, p. 233-237, 2000.
- PELOILLE, S. et al. Interactions between ovine cathepsin L, cystatin C and alpha 2-macroglobulin. Potential role in the genital tract. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 244, n. 1, p. 140-6, Feb 15 1997.
- PERRIER, A. L. et al. Two distinct proteins are associated with tetrameric acetylcholinesterase on the cell surface. *J Biol Chem*, v. 275, n. 44, p. 34260-5, Nov 3 2000.
- PETERSSON, U. et al. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. *Bone*, v. 34, n. 6, p. 949-60, Jun 2004.
- RAIJMAKERS, M. T. et al. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertility and Sterility*, v. 79, n. 1, p. 169-72, Jan 2003.
- RED-HORSE, K. et al. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. *Development (Cambridge, England)*, v. 132, n. 18, p. 4097-106, Sep 2005.
- REYES-MORENO, C. et al. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biology of reproduction*, v. 66, n. 1, p. 159-66, Jan 2002.
- ROMMELAERE, H. et al. Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 24, p. 11975-9, Dec 15 1993.
- SANZ, L. et al. The complete primary structure of the spermadhesin awn, a zona-pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *Febs Letters*, v. 300, n. 3, p. 213-218, Apr 6 1992.
- SINGLETON, C. L.; KILLIAN, G. J. A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. *Journal of Andrology*, v. 4, n. 2, p. 150-6, Mar-Apr 1983.
- SIRIGU, P.; PERRA, M. T.; TURNO, F. Immunohistochemical study of secretory IgA in the human male reproductive tract. *Andrologia*, v. 27, n. 6, p. 335-9, Nov-Dec 1995.
- SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Cellular carboxypeptidases. *Immunological reviews*, v. 161, p. 129-41, Feb 1998.

- SKIDGEL, R. A.; JOHNSON, A. R.; ERDOS, E. G. Hydrolysis of opioid hexapeptides by carboxypeptidase N. Presence of carboxypeptidase in cell membranes. *Biochemical pharmacology*, v. 33, n. 21, p. 3471-8, Nov 1 1984.
- SOLIS, D. et al. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. *Febs Letters*, v. 431, n. 2, p. 273-278, Jul 17 1998.
- SONKSEN, J.; OHL, D. A. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. *International journal of andrology*, v. 25, n. 6, p. 324-32, Dec 2002.
- SOUCEK, J. et al. Immunosuppressive activity of bovine seminal ribonuclease and its mode of action. *Immunobiology*, v. 195, n. 3, p. 271-85, Aug 1996.
- SOUZA, C. E. A. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci*, v. 105, n. 1-2, p. 72-89, Apr 2008.
- SOUZA, C. E. A. et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of proteomics*, v. 75, n. 14, p. 4436-56, 2012-Jul-19 2012.
- STERNLICHT, H. et al. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 20, p. 9422-6, Oct 15 1993.
- TOMOMASA, H. et al. Lysosomal cysteine proteinases in rat epididymis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, v. 42, n. 3, p. 417-25, Mar 1994.
- TSUJII, T. et al. [Seminal lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) isozyme activity in infertile men]. *Hinyokika kiyo. Acta urologica Japonica*, v. 48, n. 4, p. 193-7, Apr 2002.
- VALENCIA, C. A. et al. Modulation of nucleobindin-1 and nucleobindin-2 by caspases. *Febs Letters*, v. 582, n. 2, p. 286-90, Jan 23 2008.
- VAZQUEZ-ORTIZ, G. et al. Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. *BMC cancer*, v. 5, p. 68, 2005.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of reproduction*, v. 59, n. 1, p. 1-6, Jul 1998.
- WAKABAYASHI, H. et al. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 63, n. 5, p. 955-7, May 1999.
- WHITLOCK, B. K. et al. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology* v. 78, p. 737-746, 2012.
- YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote (Cambridge, England)*, v. 2, n. 4, p. 371-2, Nov 1994.
- ZHAO, C. et al. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertility and Sterility*, v. 87, n. 2, p. 436-8, Feb 2007.

Tabela 2. Proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* identificadas por eletroforese bidimensional em gel diferencial (DIGE) e espectrometria de massas (*TripleToF-MS*). (A) Representa as proteínas diferentemente expressas em amostras de sêmen coletadas por vagina artificial interna (VAI). (B) Representa as proteínas diferentemente expressas em amostras de sêmen coletadas por eletroejaculação (EEJ). Os números do *spots* se referem aos mostrados na Figura 2 e Figura 3A e 3B.

A. Proteínas com maior expressão no plasma seminal de amostras coletadas por vagina artificial interna				
Proteína	kDa/pI Experimentais	Número de acesso Swissprot/NCBI	MS/MS escore da proteína	Sequência coberta (%)
<i>Serotransferrin (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 01</i>	79,7/7,4	TRFE_BOVIN	107	03
<i>Spot 03</i>	69,1/6,9	TRFE_BOVIN	8635	51
<i>Spot 05</i>	56,8/5,6	TRFE_BOVIN	76	02
<i>Spot 06</i>	56,0/7,5	TRFE_BOVIN	158	01
<i>Spot 13</i>	70,9/8,4	TRFE_BOVIN	268	07
<i>Spot 22</i>	69,1/7,4	TRFE_BOVIN	5214	42
<i>Serum albumin (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 02</i>	79,6/7,5	ALBU_BOVIN	6748	59
<i>Spot 03</i>	69,1/6,9	ALBU_BOVIN	546	14
<i>Spot 04</i>	49,7/5,6	ALBU_BOVIN	5327	33

<i>Spot 05</i>	56,8/5,6	ALBU_BOVIN	271	03
<i>Spot 06</i>	56,0/7,5	ALBU_BOVIN	575	06
<i>Spot 07</i>	50,7/6,0	ALBU_BOVIN	4028	25
<i>Spot 20</i>	48,7/5,8	ALBU_BOVIN	9185	58
<hr/>				
<i>Fibrinogen alpha chain (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 03</i>	69,1/6,9	FIBA_BOVIN	334	08
<i>Spot 22</i>	69,1/7,4	FIBA_BOVIN	309	08
<hr/>				
<i>Alpha-2-macroglobulin (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 03</i>	69,1/6,9	A2MG_BOVIN	72	02
<hr/>				
<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 04</i>	49,7/5,6	PAFA_BOVIN	50	02
<hr/>				
<i>Phosphoglycerate mutase 2 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 08</i>	27,1/10,3	PGAM2_BOVIN	666	24
<hr/>				
<i>Metalloproteinase inhibitor 2 precursor (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 09</i>	23,7/8,9	TIMP2_BOVIN	1164	12
<i>Spot 10</i>	23,5/9,2	TIMP2_BOVIN	1359	14

<i>Spot 11</i>	10,2/6,3	TIMP2_BOVIN	32	06
<i>Spot 21</i>	22,5/9,3	TIMP2_BOVIN	103	06
<hr/> <i>Protein FAM3C (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 10</i>	23,5/9,2	FAM3C_BOVIN	67	10
<hr/> <i>Seminal ribonuclease (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 11</i>	10,2/6,3	RNS_BOVIN	66	36
<i>Spot 18</i>	10,2/6,8	RNS_BOVIN	725	36
<hr/> <i>Binder of Sperm Protein 1 – BSP 1 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 11</i>	10,2/6,3	SFP1_BOVIN	53	07
<i>Spot 17</i>	10,7/4,6	SFP1_BOVIN	1398	34
<i>Spot 18</i>	10,2/6,8	SFP1_BOVIN	58	07
<hr/> <i>Cathelicidin-1 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 11</i>	10,2/6,3	CTHL7_BOVIN	27	10
<hr/> <i>Inhibitor of carbonic anhydrase (Sus scrofa)</i>				
<i>Spot 12</i>	79,7/7,7	ICA_PIG	485	04
<hr/> <i>Ribonuclease 4 (Bos taurus)</i>				

<i>Spot 14</i>	10,2/6,7	RNAS4_BOVIN	1615	40
<i>Ephrin-A1 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 16</i>	21,9/9,3	EFNA1_BOVIN	250	10
<i>Spot 21</i>	22,5/9,3	EFNA1_BOVIN	3549	26
<i>Spot 22</i>	69,1/7,4	EFNA1_BOVIN	67	15
<i>Epididymal secretory glutathione peroxidase (Sus scrofa)</i>				
<i>Spot 16</i>	21,9/9,3	GPX5_PIG	165	08
<i>Spermadhesin-1 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 17</i>	10,7/4,6	SPAD1_BOVIN	5436	80
<i>Protein CutA (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 17</i>	10,7/4,6	CUTA_BOVIN	105	07
<i>Binder of Sperm Protein 3 – BSP 3 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 17</i>	10,7/4,6	SFP3_BOVIN	80	15
<i>Angiogenin-1 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 18</i>	10,2/6,8	ANG1_BOVIN	170	17
<i>Cathepsin S (Bos taurus)</i>				

<i>Spot 19</i>	42,7/8,6	CATS_BOVIN	332	18
----------------	----------	------------	-----	----

Glutathione S-transferase (Bos taurus)

<i>Spot 21</i>	22,5/9,3	GSTP1_BOVIN	161	22
----------------	----------	-------------	-----	----

B. Proteínas com maior expressão no plasma seminal de amostras coletadas por eletroejaculador

Proteína	kDa/pI Experimentais	Número de acesso GI	MS/MS escore da proteína	Sequência coberta (%)
-----------------	---------------------------------	--------------------------------	---	--------------------------------------

Serum albumin (Bos taurus)

<i>Spot 23</i>	76,1/5,7	ALBU_MACFA	30	04
----------------	----------	------------	----	----

Fibrinogen alpha chain (Bos taurus)

<i>Spot 53</i>	42,7/7,9	FIBA_BOVIN	68	03
----------------	----------	------------	----	----

Platelet-activating factor acetylhydrolase (Bos taurus)

<i>Spot 31</i>	65,5/5,1	PAFA_BOVIN	1253	26
----------------	----------	------------	------	----

<i>Spot 32</i>	46,6/8,9	PAFA_BOVIN	47	04
----------------	----------	------------	----	----

<i>Spot 46</i>	65,5/4,4	PAFA_BOVIN	218	09
----------------	----------	------------	-----	----

<i>Spot 55</i>	65,5/4,6	PAFA_BOVIN	894	17
----------------	----------	------------	-----	----

<i>Metalloproteinase inhibitor 2 precursor (Bos taurus)</i>				
Spot 47	25,0/7,2	TIMP2_BOVIN	1038	24
Spot 40	25,0/7,2	TIMP2_BOVIN	5178	85
Spot 37	24,7/7,6	TIMP2_BOVIN	124	62
Spot 38	24,4/8,0	TIMP2_BOVIN	120	47
Spot 39	24,3/8,2	TIMP2_BOVIN	97	37
Spot 49	23,2/8,6	TIMP2_BOVIN	97	37
Spot 42	23,7/8,9	TIMP2_BOVIN	81	34
Spot 53	42,7/7,9	TIMP2_BOVIN	47	06
<i>Seminal ribonuclease (Bos taurus)</i>				
Spot 36	32,4/9,7	RNS_BOVIN	109	24
<i>Spermadhesin-1 (Bos taurus)</i>				
Spot 48	14,2/4,6	SPAD1_BOVIN	274	52
<i>Binder of Sperm Protein 1 – BSP 1 (Bos taurus)</i>				
Spot 48	14,2/4,6	SFP1_BOVIN	4557	52
Spot 51	28,6/3,4	SFP1_BOVIN	122	21

<i>Binder of Sperm Protein 3 – BSP 3 (Bos taurus)</i>				
Spot 48	14,2/4,6	SFP3_BOVIN	47	07
<i>Angiogenin-1 (Bos taurus)</i>				
Spot 36	32,4/9,7	ANG1_BOVIN	39	15
<i>Polymeric immunoglobulin receptor (Bos taurus)</i>				
Spot 24	76,1/6,6	PIGR_BOVIN	303	03
Spot 25	74,5/7,7	PIGR_BOVIN	80	20
Spot 26	74,7/7,4	PIGR_BOVIN	91	22
Spot 28	74,8/7,1	PIGR_BOVIN	99	23
Spot 29	75,6/6,9	PIGR_BOVIN	74	22
Spot 30	76,1/6,6	PIGR_BOVIN	75	21
<i>72 kDa type IV collagenase (Bos taurus)</i>				
Spot 27	69,1/4,6	MMP2_BOVIN	850	12
<i>Alpha-1B-glycoprotein (Bos taurus)</i>				
Spot 27	69,1/4,6	A1BG_BOVIN	117	02

<i>T-complex protein 1 subunit theta (Bos taurus)</i>				
Spot 31	65,5/5,1	TCPQ_BOVIN	122	04
<i>Carboxypeptidase Q (Bos taurus)</i>				
Spot 31	65,5/5,1	CBPQ_BOVIN	66	02
Spot 46	65,5/4,4	CBPQ_BOVIN	84	02
Spot 55	65,5/4,6	CBPQ_BOVIN	117	02
<i>Phosphoglycerate kinase 2 (Equus caballus)</i>				
Spot 32	46,6/8,9	PGK2_HORSE	1007	12
<i>L-lactate dehydrogenase C chain (Sus scrofa)</i>				
Spot 33	52,0/7,6	LDHC_PIG	100	06
<i>Clusterin (Bos taurus)</i>				
Spot 34	42,7/3,2	CLUS_BOVIN	362	05
Spot 41	65,5/4,5	CLUS_BOVIN	157	08
Spot 45	56,8/3,9	CLUS_BOVIN	59	02
<i>Nucleobindin-1 (Bos taurus)</i>				

<i>Spot 41</i>	65,5/4,5	NUCB1_BOVIN	5548	54
<i>Spot 43</i>	42,7/7,0	NUCB1_BOVIN	155	02
<i>Spot 45</i>	56,8/3,9	NUCB1_BOVIN	64	02
<i>Spot 46</i>	65,5/4,4	NUCB1_BOVIN	70	02
<i>Spot 47</i>	25,0/7,2	NUCB1_BOVIN	65	02
<i>Spot 55</i>	65,5/4,6	NUCB1_BOVIN	70	02
<hr/>				
<i>Cathepsin L1 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 35</i>	42,7/6,1	CATL1_BOVIN	203	09
<i>Spot 43</i>	42,7/7,0	CATL1_BOVIN	194	04
<i>Spot 53</i>	42,7/7,9	CATL1_BOVIN	1178	24
<hr/>				
<i>Fibrinogen beta chain (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 43</i>	42,7/7,0	FIBB_BOVIN	75	07
<hr/>				
<i>Complement factor B (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 44</i>	79,7/6,8	CFAB_BOVIN	843	08
<hr/>				
<i>Spermadhesin Z13 precursor (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 48</i>	14,2/4,6	Z13_BOVIN	26	12

<i>Binder of Sperm Protein 5 – BSP 5 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 51</i>	28,6/3,4	SFP4_BOVIN	841	32
<i>Spot 52</i>	29,6/3,8	SFP4_BOVIN	1348	47
<i>Annexin A1 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 53</i>	42,7/7,9	ANXA1_BOVIN	6741	46
<i>Annexin A5 (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 53</i>	42,7/7,9	ANXA5_BOVIN	43	04
<i>Serotransferrin (Bos taurus)</i>				
<i>Spot 50</i>	71,7/8,0	TRFE_BOVIN	8551	65
<i>Spot 54</i>	70,9/8,4	TRFE_BOVIN	76	01

CAPÍTULO IV

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E DAS CÉLULAS

ESPERMÁTICAS ASSOCIADAS COM A CONGELABILIDADE DO

SÊMEN DE TOUROS *Bos indicus* DA RAÇA GUZERÁ

Proteínas do plasma seminal e das células espermáticas associadas com a congelabilidade do sêmen de touros *Bos indicus* da raça Guzerá

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo descrever as associações entre as proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides com a congelabilidade do sêmen de touros *Bos indicus* da raça Guzerá. Treze touros adultos foram avaliados por exame andrológico, tiveram o sêmen criopreservado e os parâmetros seminais após-descongelação avaliados pelo CASA, sendo definido os grupos de alta e baixa congelabilidade. As proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides em ambos os grupos foram separadas por 2-D SDS-PAGE e os *spots* associados com os parâmetros seminais pós-criopreservação foram identificados por espectrometria de massa. Os animais apresentaram, em média peso corporal ($368,8 \pm 38$ e $399,8 \pm 22,2$) e circunferência escrotal ($30,9 \pm 2,1$ e $32,1 \pm 2,0$) nos grupos de alta e baixa congelabilidade, respectivamente. Os parâmetros espermáticos pós-criopreservação, em média apresentados pelos animais foram para motilidade total ($52,4 \pm 20,5$ e $13,7 \pm 3,9$), espermatozoides normais ($89,0 \pm 2,6$ e $64,7 \pm 14,0$) e reativos ao teste hiposmótico ($38,9 \pm 4,7$ e $13,6 \pm 3,7$) nos grupos de alta e baixa congelabilidade, respectivamente. A cinética espermática pós-criopreservação de VCL, VSL, VAP e porcentagens de espermatozoides rápidos, médios e lentos foram maiores para o grupo de alta congelabilidade ($p < 0,05$). Três proteínas do plasma seminal (*osteopontin-K*, *deoxyribonuclease gamma precursor and DNASE1L3*) e cinco dos espermatozoides (*acrosome formation-associated factor isoform 2*, *annexin A1*, *desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2*, *dihydrolipoyl dehydrogenase* e *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) foram mais expressas no grupo de alta congelabilidade. Outras seis proteínas do plasma seminal (*acrosin inhibitor 1*, *glutathione peroxidase 3*, *metalloproteinase inhibitor 2*, *ephrin-A1*, *annexin*

AI e *platelet-activating factor acetylhydrolase*) foram mais expressas no grupo de baixa congelabilidade. Os modelos de regressão adotados para as intensidades dos *spots* do plasma seminal e das células espermáticas, bem como as análises de interações proteína-proteína indicam que a maioria das proteínas inversamente associadas com a viabilidade espermática pós-descongelação pode ser expressa como uma resposta a um estresse oxidativo e/ou ataque microbiano antes da criopreservação de sêmen de animais do grupo de baixa congelabilidade não detectado pelas análises convencionais do sêmen. Dessa forma, os resultados encontrados no presente trabalho podem servir de orientação para futuras pesquisas que visem o desenvolvimento de melhores diluentes e/ou a melhoria da seleção de doadores de sêmen para criopreservação.

Palavras-chaves: andrologia, criopreservação, espermatozoide, proteômica

ABSTRACT

The objective of the present study was to describe the relationship of seminal plasma and total sperm proteins with seminal freezability parameters of *Bos indicus* Guzerat bulls. Thirteen, adult bulls were subjected to breeding soundness evaluation and the semen samples were cryopreserved and post-thawing sperm kinects were assessed by CASA, where high and low freezability groups were defined. Seminal plasma and total sperm proteins extract from both groups were separated by 2-D SDS-PAGE and spots associated with post-thawing sperm parameters were identified by mass spectrometry. Animals presented, in average body weight of 368.8 ± 38 and $399.8 \pm 22,2$ and scrotal circumference of 30.9 ± 2.1 and 32.1 ± 2.0 in high and low freezability groups, respectively. Seminal parameters post-cryopreservation, in average for total motility (52.4 ± 20.5 e 13.7 ± 3.9), percentage of normal sperm (89.0 ± 2.6 e 64.7 ± 14.0) and reative of the hyposmotic test (38.9 ± 4.7 e 13.6 ± 3.7) in high and low freezability

group, respectively. Post-thawing sperm velocities as VCL, VSL, VAP and the percentages of rapids, medium, slow, were greater in high freezability group ($p < 0.05$). Three seminal plasma proteins (Osteopontin-K and deoxyribonuclease gamma precursor and DNASE1L3) and five from the whole sperm extract (acrosome formation-associated factor isoform 2, annexin A1, desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2, dihydrolipoyl dehydrogenase and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were highly expressed in the high freezability group. On the other hand, other six seminal plasma proteins (Acrosin inhibitor 1, glutathione peroxidase 3, metalloproteinase inhibitor 2, ephirin-A1, annexin A1 and platelet-activating factor acetylhydrolase) were higher in the low freezability groups. Multiple linear regression adopting the intensities of seminal plasma and whole sperm protein spots as independent variables and the post-thawing semen traits as dependent variables, and also the protein-protein interaction analysis indicate that most proteins inversely associated with post-thawing sperm viability might be expressed as a response to a silent oxidative stress and/or microbial attack prior to cryopreservation of semen from animals in the low freezability group, not detected by the conventional semen analysis, but sufficient to lead higher damages after thawing. Thus the present results may serve as guidelines for future researches aiming the development of better extenders and/or the improvement of semen selection to cryopreservation.

Key-words: spermatozoa, proteomics, cryopreservation, andrology

INTRODUÇÃO

O sêmen de mamíferos é um fluido orgânico composto pelos gametas masculinos e pelo plasma seminal, meio carreador destas células. A importância fisiológica do plasma seminal, além de servir como veículo para as células espermáticas, relaciona-se com a composição proteica do mesmo, a qual é capaz de atuar na maturação e proteção espermática durante o trânsito epididimário (DACHEUX et al., 2003; BELLEANNEE et al., 2011), manter a motilidade espermática após a ejaculação (FINK et al., 1989), contribuir com os processos de capacitação e interação do espermatozoide com o epitélio do oviduto (THERIEN et al., 1998; 1999; GWATHMEY et al., 2006) e participar de eventos ligados à reação acrossômica, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (GONCALVES et al., 2007; GONCALVES et al., 2008; HAO et al., 2008). Assim como no plasma seminal, diversos estudos sobre o proteoma do espermatozoide foram desenvolvidos em várias espécies como homem (MARTINEZ-HEREDIA et al., 2006), camundongo e rato (BAKER et al., 2008a; BAKER et al., 2008b) e touro (PEDDINTI et al., 2008). Ainda relacionado ao tema, estudos sobre o proteoma compartimentalizado dos espermatozoides como núcleo (CASTILLO et al., 2013), superfície da célula (BREWIS; GADELLA, 2010; Byrne et al., 2012) tem adicionado importantes informações sobre a utilização destas proteínas como marcadores moleculares de doenças, fertilidade e/ou subfertilidade.

O proteoma do espermatozoide de touros é diverso podendo ser composto por uma infinidade de proteínas diferentes e, embora as funções da maioria destes componentes não estejam completamente compreendidas, acredita-se que muitas destas proteínas participam de etapas específicas do processo de fertilização podem constituir marcadores de fertilidade nestes animais (D'AMOURS et al., 2010; GAVIRAGHI et al.,

2010). Em outro aspecto, proteínas dos espermatozoides e do plasma seminal de humanos contribuem com a resistência da célula ao processo de criopreservação e sinalizam, portanto, sobre como determinadas amostras de sêmen respondem a esta biotécnica da reprodução (ZHANG; XIONG, 2013). As proteínas presentes no plasma seminal de bovinos (JOBIM et al., 2002; JOBIM et al., 2004) e de equinos (JOBIM et al., 2011) mostraram associações com os parâmetros seminais pós-descogelação, sendo consideradas potenciais marcadores desta característica. Em bovinos, já foi demonstrado que a *Binder of Sperm Proteins 1* (PDC 109) influencia negativamente os parâmetros seminais pós-criopreservação e que diminuição desta proteína livre no plasma seminal através do “sequestro” por anticorpos melhorou a resposta do espermatozoide criopreservação (SRIVASTAVA et al., 2012). Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar as proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides de touros *Bos indicus* adultos da raça Guzerá e suas associações com a congelabilidade do sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de sêmen e análises pré-criopreservação

Vinte e um touros da raça Guzerá, criados sob condições uniformes de manejo e nutrição no Nordeste do Brasil, na Fazenda Canhotinho situada no município de Quixeramobim no Sertão Central do Ceará (5° 11'56" S, 39° 17'34" W), foram submetidos à avaliação andrológica dos 25 aos 34 meses de idade. Em resumo, as coletas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação (FURMAN et al., 1975). Uma alíquota de 20 µL de amostra de sêmen de cada touro foi colocada em uma lâmina e avaliada em microscópio (100 x) quanto à motilidade massal (0 – 5). Outra alíquota de sêmen foi colocada em lâmina e avaliada quanto à motilidade (%) e vigor (0 – 5). A concentração

espermática foi estimada pela diluição (1:200) de uma alíquota de sêmen em solução de formol-salina, sendo as células contadas em câmara de Neubauer em microscópio (400 x). Três esfregaços de alíquotas de sêmen fresco foram feitos para cada touro e as lâminas, coradas pelo método de eosina-nigrosina (BARTH; OKO, 1989). Duzentas células por lâmina foram contadas em microscópio (1000 x) para a avaliação da morfologia espermática, considerando as porcentagens de cabeça, peça intermediária e cauda com defeitos, gotas citoplasmáticas e células espermáticas normais.

Aos 34 meses de idade, treze touros foram selecionados do grupo original de 21 animais para o experimento de criopreservação. Nesta idade, os 13 indivíduos consistentemente apresentaram os critérios mínimos para a utilização de um reprodutor para monta a campo (motilidade >70%, vigor >3 e total de espermatozoides com defeitos $\leq 30\%$), de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). O sêmen dos treze animais foi utilizado para a criopreservação, onde uma alíquota de 1mL de sêmen foi misturada com 10 μL de um *cocktail* de inibidores de protease, contendo AEBSF (*4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride*), *pepstatin A*, *E-64*, *bestatin*, *leupeptin and aprotinin* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para futuras análises das proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides. O restante do sêmen foi diluído em meio crioprotetor contendo gema de ovo, lactose, glicerol e antibióticos (Nagase et al., 1964), na quantidade suficiente para atingir a concentração de 30×10^6 sperm/mL. Após a diluição, o sêmen foi mantido em banho maria por 10 minutos a 34°C para estabilização e por fim envazados em palhetas de 0,5 mL. As palhetas foram submetidas ao resfriamento a uma taxa de -0,55 °C/min até a temperatura atingir 4 °C, permanecendo nestas condições por 4 horas. As palhetas então foram colocadas em uma plataforma posicionada a 5 cm acima do nitrogênio líquido e submetidas ao congelamento a uma taxa

de -19,1 °C/min até atingir a temperatura aproximada de -153 °C sendo, em sequência, imersas no nitrogênio e mantidas assim ate posteriores análises.

Avaliação do sêmen pós-criopreservação

Duas palhetas de sêmen criopreservado de cada touro foram descongeladas e agrupadas para avaliação da cinética espermática e outras duas palhetas foram descongeladas para avaliação da integridade da membrana plasmática. A descongelação das palhetas foi realizada em banho Maria a 37°C por 30s e os parâmetros seminais, avaliados em microscópio de contraste de fases acoplado a uma câmera de vídeo e um sistema para *Computer-assisted semen analysis (CASA) Sperm Class Analyzer*[®] (SCA[®], Microptics S.L., Barcelona, Spain, v. 3.2.0). Alíquotas de 5µl de sêmen foram submetidas à avaliação pelo CASA onde selecionou-se cinco campos para a análise da motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), porcentagem de espermatozoides rápidos e lentos, velocidade real da trajetória espermática (VCL µm/s), velocidade linear (VSL µm/s), velocidade média do percurso (VAP µm/s), retilinearidade (STR,%) e linearidade (LIN,%). Com base na cinética espermática pós-descongelamento, separou-se os touros em grupos de alta (motilidade total ≥ 30 %) e de baixa (motilidade < 30 %) congelabilidade. Tal critério de divisão foi anteriormente descrito por (FELIPE-SILVA et al., 2011) e corrobora com os critérios pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Outros parâmetros seminais pós-descongelamento também foram considerados para a divisão dos touros nos grupos de alta e baixa congelabilidade, como a motilidade progressiva e não-progressiva, porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais e reativos ao teste hiposmótico (HOST).

Teste hiposmótico (HOST)

Duas palhetas de sêmen de cada animal foram descongeladas como descrito acima e uma alíquota de 100 µL de sêmen, adicionada a 1 mL de solução hiposmótica contendo citrato de sódio e frutose (100mOsmol/mL) e incubada a 37 °C por uma hora. Após esta etapa, as amostras foram fixadas em 0,2 mL de tampão de formol-salina e submetidas à análise em microscópio de contraste de fases, com aferição da porcentagem de espermatozoides com membrana reativa funcional (cauda enrolada) presente em um total de 200 células espermáticas avaliadas por animal (CORREA et al., 1997).

Análise proteômica do plasma seminal e dos espermatozoides

Extração da proteína total dos espermatozoides

Imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota do mesmo ejaculado destinado a criopreservação foi centrifugada a 700 x g por 15 minutos a 4 °C para separar o plasma seminal dos espermatozoides, sendo ambos congelados a -20 °C para posteriores análises (RÊGO, 2010). As proteínas dos espermatozoides foram extraídas como descrito por VAN TILBURG et al. (2013a), com modificações. Resumidamente, os *pellets* dos espermatozoides foram descongelados em temperatura ambiente e lavados três vezes com PBS (*phosphate buffer saline*). Após a lavagem final, o *pellet* foi ressuspenso em 1,5 mL de PBS contendo 1% (vol/vol) de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os espermatozoides de cada amostra foram homogeneizados com 20 ciclos (3 segundos cada) utilizando um dispositivo tipo triturador. Foi adicionado triton X-100 1% (vol/vol) ao extrato contendo os fragmentos dos espermatozoides e incubado por 2 horas a 4 °C sob agitação. As amostras foram sonicadas por 30 minutos em água gelada (4 °C) e centrifugadas a 5000 x g, 60 por minutos, 4 °C. O sobrenadante foi retido e as proteínas precipitadas com acetona através

da adição de 1 volume de amostra com 9 volumes de acetona à -20 °C por 2 horas. As proteínas precipitadas foram centrifugadas a 5000 g, por 60 minutos a 4 °C, sendo o *pellet* seco ao ar *overnight*. O *pellet* foi ressuspensão em tampão de reidratação (7 M ureia, 2 M tiourea, 40 mM dithiothreitol [DTT], 2% free ampholytes [IPG buffer, pH 4-7 (GE LifeSciences, USA)], 4% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate). As proteínas dos espermatozoides foram diluídas em água (1:50) e a concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão (Sigma-Aldrich, USA).

As proteínas totais dos espermatozoides foram separadas por eletroforese bidimensional (RÊGO, 2010; VAN TILBURG et al., 2013a). Em resumo, um total de 400 µg de proteína foi misturado com o tampão de reidratação (7 M ureia, 2 M tiourea, 2% freeampholytes [IPG buffer, pH 4-7 (GE LifeSciences)], 2% 3-[(3cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, and traces of bromophenol blue) suficientes para um total de 250 µL. As amostras foram incubadas com tiras de 13-cm IPG (pH 4–7, linear; GE LifeSciences, Piscataway, NJ, USA), por aproximadamente 16 horas. A focalização isoeétrica foi conduzida em um equipamento ETTAN IPGphor 3 (GE LifeSciences, USA) a 20 C, com a seguinte programação: 250 Volts (V) (750 Volts horas (Vh)), 500 V (500 Vh), 800 V (800 Vh), 1000 V (1000 Vh), 8000 V (1 h, em gradiente), e 8000 V (32,000 Vh), com um total de aproximadamente 43,050 Vh. Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio I durante 15 minutos (6 M ureia, 50 mM Tris–HCl pH 8.8, 29.3% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 1% w/v DTT) e reequilibradas por mais 15 minutos com o tampão II (tampão de equilíbrio I contendo 2,5% w/v de iodoacetamida no lugar do DTT). Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram fixadas com agarose (5% em tampão de corrida) no topo do gel

de poliacrilamida (12,5%) e separados a 250 V com 20 mA por gel (EPS 601 Power Supply; GE Lifesciences, USA).

Proteínas do plasma seminal

Uma amostra de plasma seminal de cada touro, contendo um total de 600 µg de proteína, foi adicionada ao tampão de reidratação (7 M ureia, 2 M tiourea, 65 mM DTT [dithiothreitol], 0,5% v/v anfólitos livres [IPG buffer, pH 3–11], 0,5% w/v CHAPS [3-3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propanesulfonate] e traços de azul de bromofenol) suficientes para completar um volume de 340 µL de tampão mais proteína. A solução contendo as proteínas foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubadas com tiras de 18 cm IPG (immobilized pH gradient; pH 3 a 10, linear; GE Lifesciences, USA) por aproximadamente 16 h. A focalização isoeletrica foi conduzida em um equipamento ETTAN IPGphor 3 (GE LifeSciences, USA) a 20 °C com a seguinte programação: 200 V (200 Vh), 500 V (500Vh), 1000 V (1000Vh), 5000 V (5000 Vh) e 10,000 (60,000 V h) (66.700 V totais, aproximadamente) além de um passo adicional de 30 V para evitar a difusão proteica no final da focalização. Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio I durante 15 minutos (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 1% w/v DTT) e reequilibradas por mais 15 minutos com o tampão II (tampão de equilíbrio I contendo 2,5% w/v de iodoacetamida no lugar do DTT). Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram fixadas com agarose (5% em tampão de corrida) no topo do gel de poliacrilamida (15%) em uma cuba modelo Ettan™ DALTsix system (GE Lifesciences, USA) e corrida a 40 mA por gel (Hoefler SE 600; GE Lifesciences, USA) (RÊGO, 2010).

Coloração dos géis com Coomassie blue G-250

Os géis foram corados com Coomassie G-250 (Candiano et al., 2004; Rêgo, 2010). Em resumo, após a segunda dimensão, os géis foram lavados três vezes (20 minutos cada) com uma solução contendo ácido fosfórico (2%) e etanol (30%) em água, seguidos de mais três lavagens com ácido fosfórico (2%) em água. Os géis foram imersos por 72 h em solução com ácido fosfórico (2%), etanol (18%) e sulfato de amônio (15%), adicionados de 2 mL de solução de Coomassie G-250 (2% w/v).

Análises das imagens dos géis pelo aplicativo PDQuest

Os géis bidimensionais foram escaneados a 600 dpi (ImageScanner II; GE LifeSciences, USA), as imagens salvas em arquivos de formato (.tiff) e analisadas pelo aplicativo PDQuest (version 7.3.0; Bio-Rad, USA). De acordo com metodologia previamente descrita (MOURA et al., 2007b; MOURA et al., 2010; RÊGO, 2010), todos os mapas bidimensionais foram avaliados em um único *match set*. Um gel representativo foi criado com base nos géis de todos os indivíduos e spots presentes de forma consistente nos mapas também foram adicionados ao gel *master*. Proteínas presentes em diferentes regiões dos géis foram utilizadas como marcos de localização de forma a permitir o alinhamento correto de cada spot nos diferentes géis. A quantificação dos spots foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, conforme definido pelo aplicativo.

Identificação das proteínas por electrospray ionization quadrupole-time-of-flight (ESI-Q-ToF) mass spectrometry

Os *spots* do plasma seminal e dos espermatozoides associados com os parâmetros seminais pós-criopreservação juntamente com outros *spots* considerados

marcadores em diferentes partes dos géis foram cortados e digeridos (MOURA et al., 2007b; RÊGO, 2010). Resumidamente, os spots de interesse foram cortados individualmente de três géis em pedaços de aproximadamente 1 mm³ e completamente descorados com 400 µL de solução contendo acetonitrila 50% (ACN)/bicarbonato de amônio (50% a 25 mM, pH 8,0) ficando nesta solução aproximadamente 16 horas. Os spots foram desidratados duas vezes com 200 µL de acetonitrila absoluta durante 5 minutos e secos à temperatura ambiente. As proteínas foram incubadas por, aproximadamente, 20 horas, a 37°C, com solução contendo tripsina (20 ng per spot; Promega, cat #v511; Madison, WI, USA), ácido acético 50 mM (solução estoque 200 ng/µL) e diluída com bicarbonato de amônio 50 mM. Os peptídeos foram extraídos através de lavagens com solução de 5% de ácido trifluoroacético (TFA), 50% de ACN em solução de bicarbonato de amônio (50 mM) por 30 minutos, sendo submetidos a três lavagens. Os extratos foram acondicionados em micro tubos (Eppendorf, USA) e secos utilizando o equipamento *speed vacuum concentrator* (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA). Um pedaço de gel sem *spots* e um spot referente a albumina proveniente do marcador molecular usado na segunda dimensão foram submetidos ao mesmo procedimento e utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

As amostras contendo os peptídeos foram injetadas utilizando um *nanoAcquity UPLC* e uma separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna UPLC C18 (75 µm x 10 cm) com um fluxo de 0,6 µL/minuto. Os espectros de massa foram adquiridos em um instrumento Synapt G2 HDMS Acquity UPLC (Waters Co., Milford, MA, USA), utilizando uma aquisição dado-dependente onde os três picos principais foram submetidos ao MS/MS. As fases móveis A e B consistiam em 0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em ACN, respectivamente. As condições dos gradientes que foram usados foram como se segue: 0 minutos, com 3% de B,

aumentando linearmente para 30% de B em 20 minutos, em seguida, aumentou-se para 70% B em 40 minutos em que se manteve até 50 minutos e, no minuto seguinte foi diminuído para 3% de B. Os dados foram processados utilizando o *Protein Lynx Global Server* (Waters Co.) e submetidos a busca utilizando o MASCOT no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e SwissProt acessados via *Australian Proteomics Computational Facility* (www.apcf.edu.au). Os parâmetros de busca utilizados incluem a tripsina como enzima, com no máximo de 1 cleavagem perdida, tolerância de erro de 100 ppm (MS) e 0,1 Da (MS/MS). Foram utilizadas como modificações a carbamidometilação da cisteína como fixa e a oxidação da metionina como variável.

Análise das interações proteína-proteína

As proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides que apresentaram associação com os parâmetros seminais pós-criopreservação foram analisadas através das ferramentas do aplicativo MetaCore v. 6.8 (<http://portal.genego.com>; GeneGo, St. Joseph, MI, USA). As análises do MetaCore são baseadas nos bancos de dados de anotações manuais, incluindo interações proteína-proteína, rotas metabólicas e de sinalizações obtidos a partir da literatura científica. O nome das proteínas foi inserido manualmente no sistema e as interações, processadas utilizando-se vias canônicas com máximos de 30 nós por proteína (LANDI et al., 2013). As proteínas analisadas pelo aplicativo MetaCore foram: *acrosin inhibitor 1* (SPINK2), *glutathione peroxidase 3* (GPX3), *metalloproteinase inhibitor 2* (TIMP2), *Ephirin-A1*(EFNA1), *low molecular weight isoform of sperm glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase testis-specific* (G3PT), *desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2* (ADAM2). Em função dos modelos múltiplos de regressão (descritos na seção de descrição a análise

estatística), estas proteínas apresentaram associações significativas com os parâmetros espermáticos pós-criopreservação dos touros Guzerá.

Análise estatística

Todas as variáveis deste estudo foram avaliadas quanto à distribuição normal através do *Shapiro-Wilk test* e assimetria por curtose utilizando o *UNIVARIATE procedure of Statistical Analysis System* (SAS, v. 9.0, 2002), com a opção *NORMAL*. Transformações logarítmicas ($\log(x+1)$) ou angulares ($\arcsin(\sqrt{x/100})$) foram feitas quando necessárias. As variáveis que não tiveram sucesso nas transformações foram considerados não-paramétricas. As variáveis paramétricas dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco e pós-criopreservado, bem como as intensidades dos *spots* proteicos do plasma seminal e das células espermáticas foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento *GLM* do SAS, sendo as médias comparadas entre grupos de alta e baixa congelabilidade através do teste de *Tukey* ou *Student*, de acordo com o coeficiente de variação ($CV\% < 30$ ou ≥ 30 , respectivamente). As variáveis não-paramétricas foram comparadas entre os grupos pelo teste de *Mann-Whitney* utilizando o procedimento *NPARIWAY* do SAS, com a opção *WILCOXON*. Os modelos lineares múltiplos de regressão foram estimados utilizando o procedimento *REG* com uma seleção em *stepwise* do aplicativo SAS. Nestes modelos, utilizou-se as intensidades dos *spots* como variáveis independentes e os parâmetros espermáticos pós-criopreservação, como variáveis dependentes. Somente as variáveis independentes com $p < 0.05$ foram mantidas nas equações de regressão.

RESULTADOS

Características e parâmetros seminais dos touros com alta e baixa congelabilidade do sêmen

As avaliações de peso vivo, condição corporal, circunferência escrotal, idade e parâmetros seminais pré-criopreservação dos touros Guzerá estão descritos na Tabela 1. Os valores médios obtidos para a cinética espermática dada pelo CASA pós-criopreservação (motilidade total, progressiva e não-progressiva, % de espermatozoides rápidos, médios e lentos, VCL, VSL, VAP), porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e reativos ao teste hiposmótico (HOST) foram maiores no grupo de alta congelabilidade ($p < 0.05$; Tabela 2). No entanto, os resultados obtidos para defeitos espermáticos e espermatozoides estáticos foram maiores no grupo de baixa congelabilidade ($p < 0.05$; Tabela 2). Os parâmetros de LIN, STR e WOB, estimados através do CASA, não diferiram entre os dois grupos de touros.

Tabela 1. Características ponderais e de sêmen pré-criopreservação (média \pm EPM) em grupos de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen. Não houve diferença significativa para os parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

Parâmetros mensurados	Grupo de congelabilidade	
	Alta (n = 7)	Baixa (n=6)
Idade (meses)	33,3 \pm 1,9	34,2 \pm 1,3
Peso corporal (kg)	368,8 \pm 38	399,8 \pm 22,2
Escore corporal (1 – 5)	3,6 \pm 0,2	3,5 \pm 0,3
Circunferência escrotal (cm)	30,9 \pm 2,1	32,1 \pm 2,0
Motilidade total (%)	80,7 \pm 7,9	79,2 \pm 8,6
Motilidade massal (0 – 5)	2,3 \pm 1,1	3,1 \pm 1,3
Vigor (0 – 5)	3,8 \pm 0,9	3,9 \pm 0,9
Espermatozoides normais (%)	90,8 \pm 3,4	92,7 \pm 1,5
Defeitos maiores (%)	4,2 \pm 1,9	3,0 \pm 1,8
Defeitos menores (%)	4,9 \pm 1,6	4,3 \pm 1,1

Tabela 2. Características seminais pós-criopreservação (média \pm EPM), avaliadas pelo CASA, de touros Guzerá com alta e baixa congelabilidade do sêmen.

Parâmetros espermáticos	Grupo de congelabilidade	
	Alta (n = 7)	Baixa (= 6)
MOT (%)	52,4 \pm 20,5 ^a	13,7 \pm 3,9 ^b
NORM (%)	89,0 \pm 2,6 ^a	64,7 \pm 14,0 ^b
DM (%)	5,0 \pm 2,2 ^b	18,5 \pm 6,6 ^a
Dm (%)	6,0 \pm 1,3 ^b	16,6 \pm 7,9 ^a
HOST (%)	38,9 \pm 4,7 ^a	13,6 \pm 3,7 ^b
NPROG (%)	24,0 \pm 7,6 ^a	7,8 \pm 3,8 ^b
PROG (%)	28,4 \pm 19,9 ^a	5,3 \pm 2,8 ^b
RAPID (%)	31,2 \pm 13,2 ^a	6,2 \pm 3,3 ^b
MED (%)	9,1 \pm 7,7 ^a	1,9 \pm 1,6 ^b
LENT (%)	12,0 \pm 4,5 ^a	5,0 \pm 4,5 ^b
ESTATIC (%)	47,6 \pm 20,5 ^b	86,9 \pm 3,3 ^a
VCL (μ /s)	76,7 \pm 12,8 ^a	61,2 \pm 11,5 ^b
VSL (μ /s)	40,8 \pm 9,8 ^a	31,2 \pm 6,4 ^b
VAP (μ /s)	49,2 \pm 8,5 ^a	38,9 \pm 7,7 ^b
LIN (%)	52,4 \pm 10,5	51,8 \pm 10,1
STR (%)	80,7 \pm 8,7	80,4 \pm 3,9
WOB (%)	63,9 \pm 7,6	63,9 \pm 8,4

MOT = espermatozoides móveis; NORM = espermatozoides morfologicamente normais; DM = defeitos espermático maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; HOST = espermatozoides reativos (com membrana plasmática funcional) no teste hiposmótico; STATIC = espermatozoides estáticos; NPROG = espermatozoides móveis não progressivos; PROG = espermatozoides móveis progressivos; RAPID = espermatozoides rápidos; MED = espermatozoides médios; SLOW = espermatozoides lentos; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade; STR retilinearidade; WOB = índice de oscilação. Para cada parâmetro, na mesma linha, letras diferentes representam variações significativas ($p < 0,05$).

Proteínas do plasma seminal e espermáticas

Oito *spots* proteicos dos mapas bidimensionais do plasma seminal foram diferencialmente expressos entre os grupos de alta e baixa congelabilidade. Os *spots* 2 (*osteopontin-K*) e 22 (*deoxyribonuclease gamma precursor and DNASE1L3 protein*) apresentaram maior intensidade nos mapas 2-D do grupo de alta congelabilidade (Figuras 1 e 2). Os *spots* 1 (*acrosin inhibitor 1*), 8 (*glutathione peroxidase 3*), 10 (*metalloproteinase inhibitor 2*), 13 (*metalloproteinase inhibitor 2 and ephirin-A1*), 14 (*annexin A1*) e 18 (*platelet-activating factor acetylhidrolase*) tiveram maior intensidade nos mapas 2-D do grupo de baixa congelabilidade (Figuras 1 e 2).

Seis *spots* presentes nos mapas 2-D das proteínas espermáticas foram diferencialmente expressos entre os grupos de alta e baixa congelabilidade. Todos os seis *spots* tiveram maior expressão no grupo de alta congelabilidade e foram identificados como *acrosome formation-associated factor isoform 2 (spot 36)*, *annexin A1 (spot 39)*, *desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2 (spot 46)*, *dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 (spot 50 e spot 51)* e *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific (spot 52)* (Figuras 3 e 4).

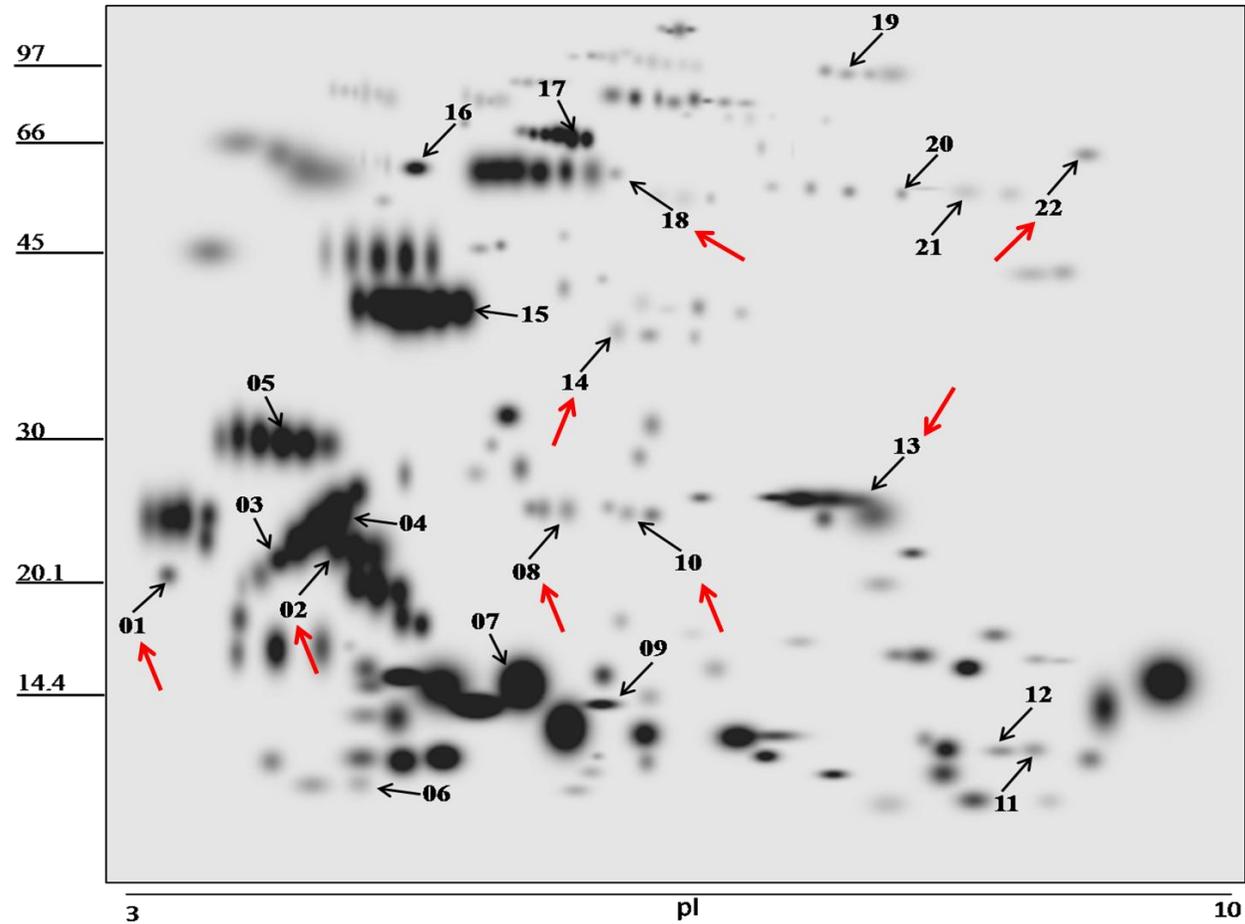


Figura 1. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros Guzerá gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, USA), baseado no *match set* com todos os 13 géis utilizados no estudo. Os *spots* mostrados em vermelho representam aqueles diferencialmente expressos entre os grupos de alta e baixa congelabilidade, associados com os parâmetros seminais pós-criopreservação. Os demais *spots* foram identificados e utilizados como marcadores de diferentes regiões do gel. Os números dos *spots* referem-se aos mostrados na Figura 2 e Tabela 3. As proteínas foram separadas e identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (*ESI-QUAD-ToF*).

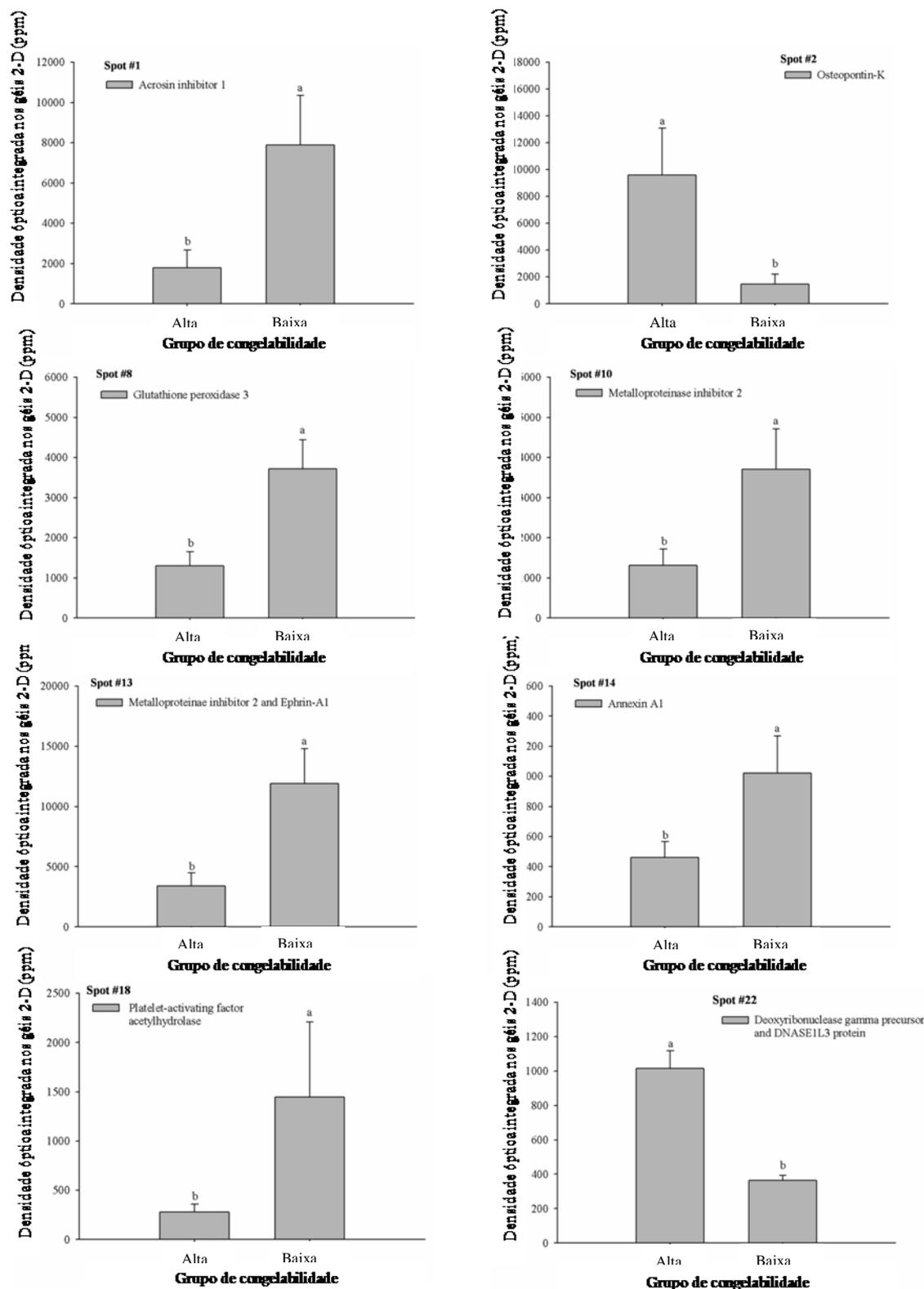


Figura 2. *Spots* diferencialmente expressos nos mapas 2-D do plasma seminal de touros Guzerá (médias \pm EPM) com alta e baixa congelabilidade do sêmen. Os números dos *spots* referem-se aos mostrados na Figura 1 e Tabela 3. As proteínas foram separadas e identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (*ESI-QUAD-ToF*).

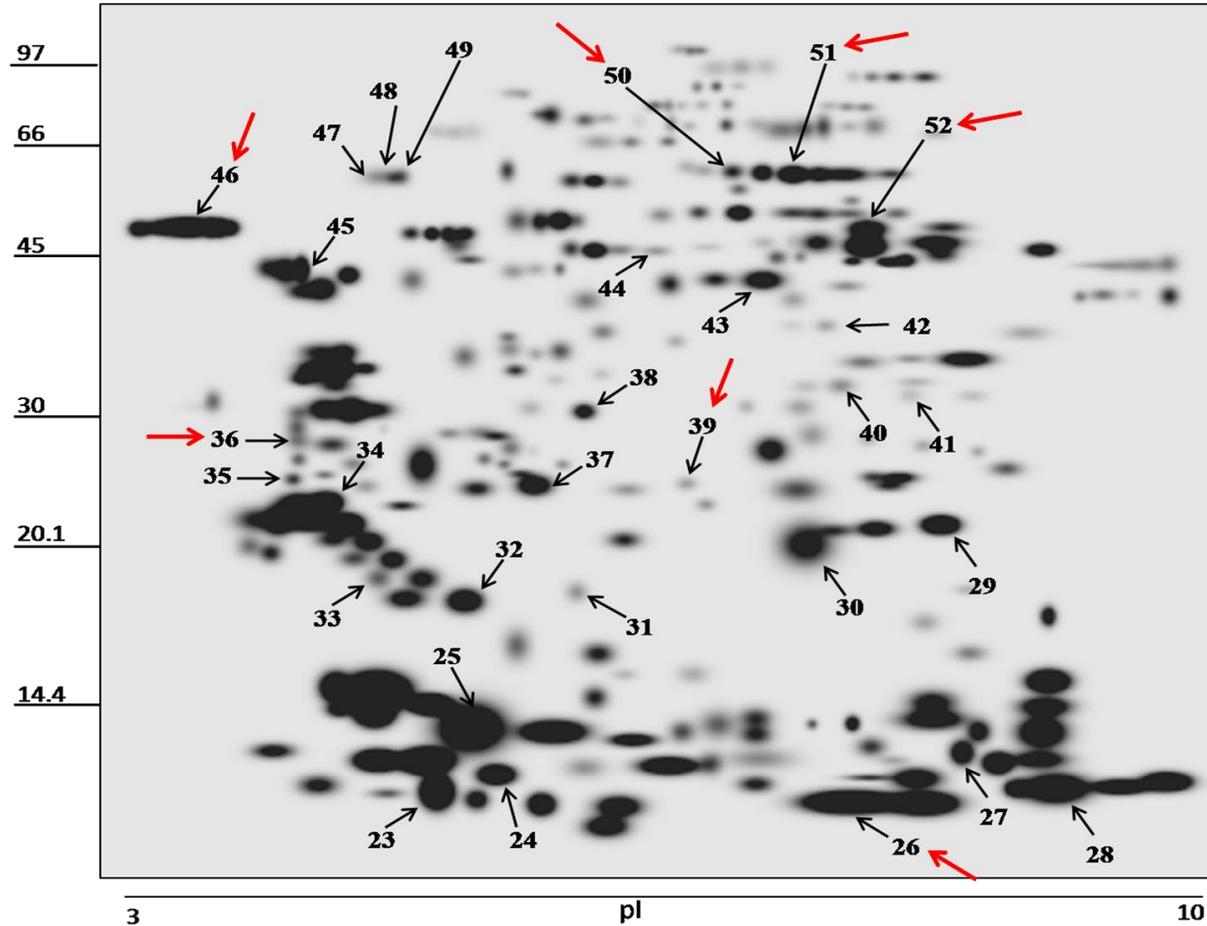


Figura 3. Mapa bidimensional das proteínas dos espermatozoides de touros Guzerá gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, USA), baseado no *match set* com todos os 13 géis utilizados no estudo. Os *spots* mostrados em vermelho representam aqueles diferencialmente expressos entre os grupos de alta e baixa congelabilidade, associados com os parâmetros seminais pós-criopreservação. Os demais *spots* foram identificados e utilizados como marcadores de diferentes regiões do gel. Os números dos *spots* referem-se aos mostrados na Figura 4 e Tabela 4. As proteínas foram separadas e identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (*ESI-QUAD-ToF*).

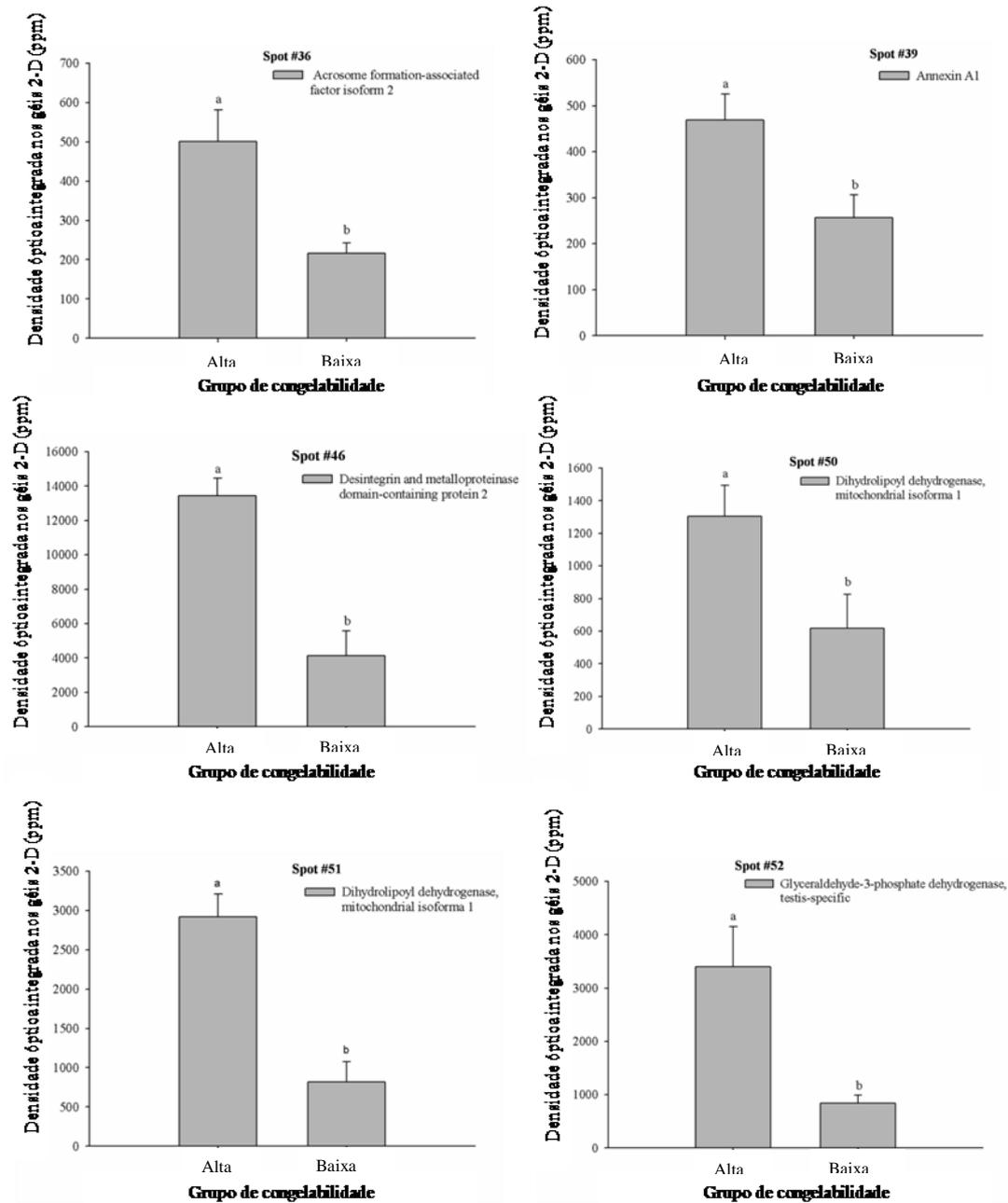


Figura 4. *Spots* diferencialmente expressos nos mapas 2-D dos espermatozoides de touros Guzera (médias \pm EP) com alta e baixa congelabilidade do sêmen. Os números dos *spots* referem-se aos mostrados na Figura 3 e Tabela 4. As proteínas foram separadas e identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (*ESI-QUAD-ToF*).

Modelos de regressão

Os modelos lineares múltiplos mostraram uma associação negativa entre os *spots* presentes nos mapas 2-D do plasma seminal com os parâmetros seminais pós-criopreservação de motilidade espermática (*spot* 1, *acrosin inhibitor 1*; Figura 5A), porcentagem de espermatozoides normais (*spot* 8, *glutathione peroxidase 3*, Figura 5B e *spot* 13, *metalloproteinase inhibitor 2 and ephirin-A1*, Figura 5D), porcentagem de espermatozoides reativos ao HOST (*spot* 13, *metalloproteinase inhibitor 2 and ephirin-A1*, Figura 5C) (Figuras 1 e 2; Tabela 3).

Determinou também uma associação negativa entre o *spot* 26 (Figura 3), presente nos géis com proteínas espermáticas e identificado como uma *low molecular weight isoforme of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, com a motilidade espermática (Figura 5E). No entanto, os modelos lineares de regressão também mostraram uma associação positiva entre o *spot* 46 (*disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2*; Figura 5F) com a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais (Figuras 3 e 4; Tabela 4).

Interações proteína-proteína

As análises do MetaCore para as proteínas dos *spots* do plasma seminal e dos espermatozoides associadas com os parâmetros seminais pós-criopreservação, mostraram uma complexa interação biológica entre as proteínas. As figuras 6A, B, C, D, E e F mostram uma interação variada das proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides com componentes ligados a rotas de sinalização intracelular e extracelular, fatores de transcrição, receptores, glicoproteínas de membrana, proteínas de ligação, fatores de regulação, enzimas e outras proteínas.

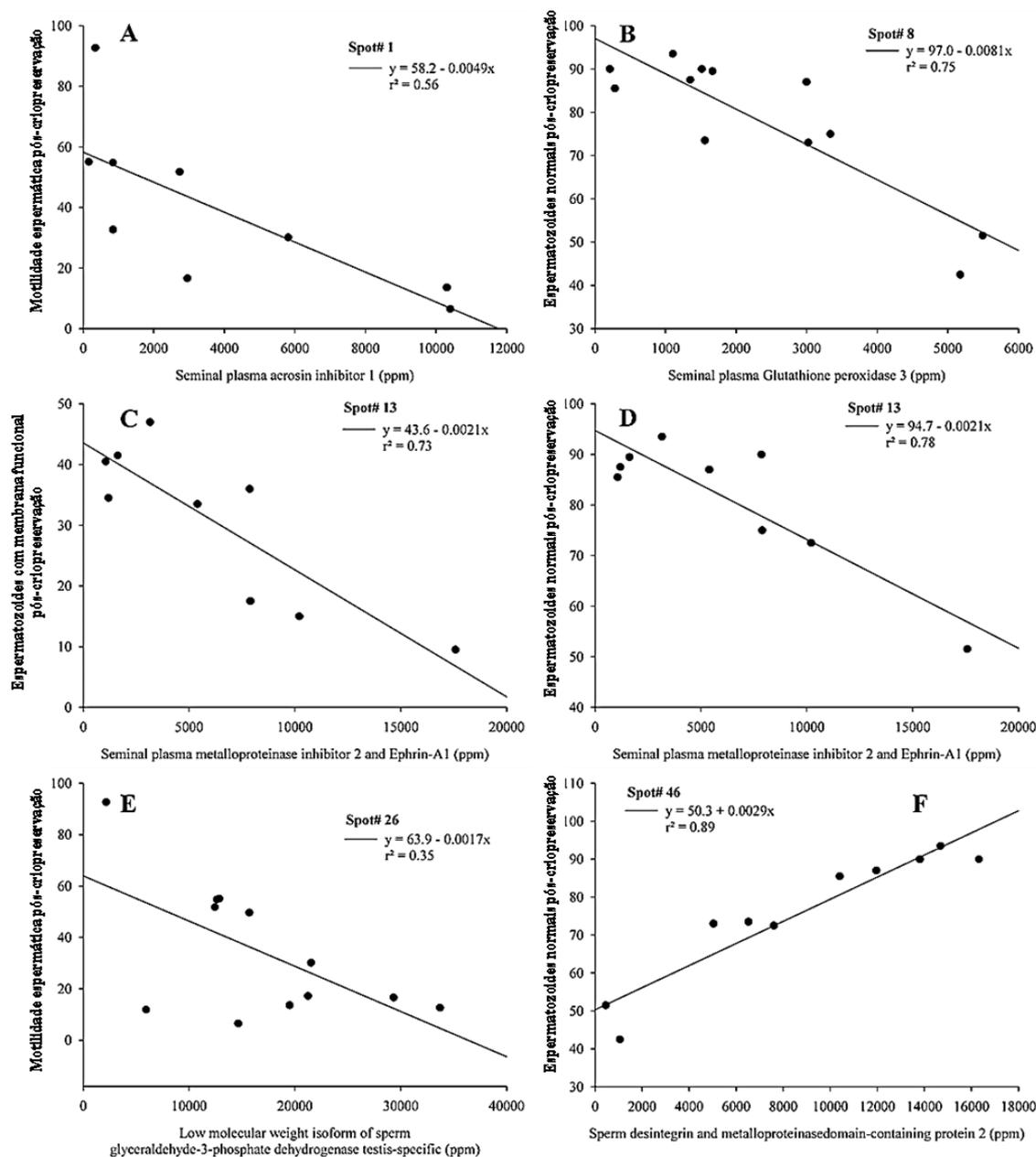
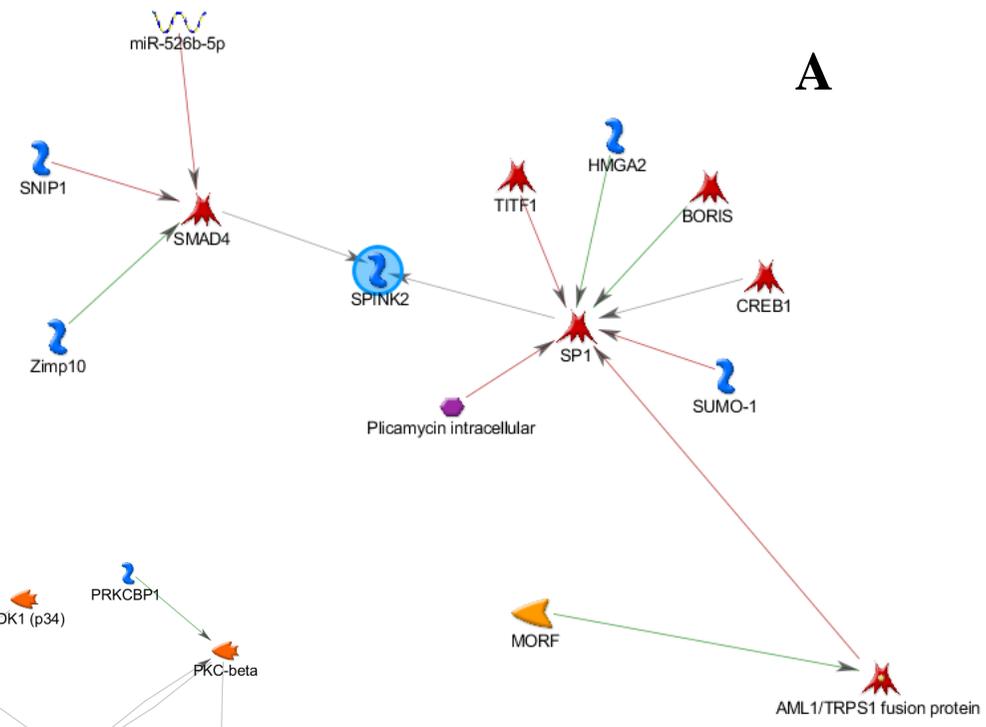
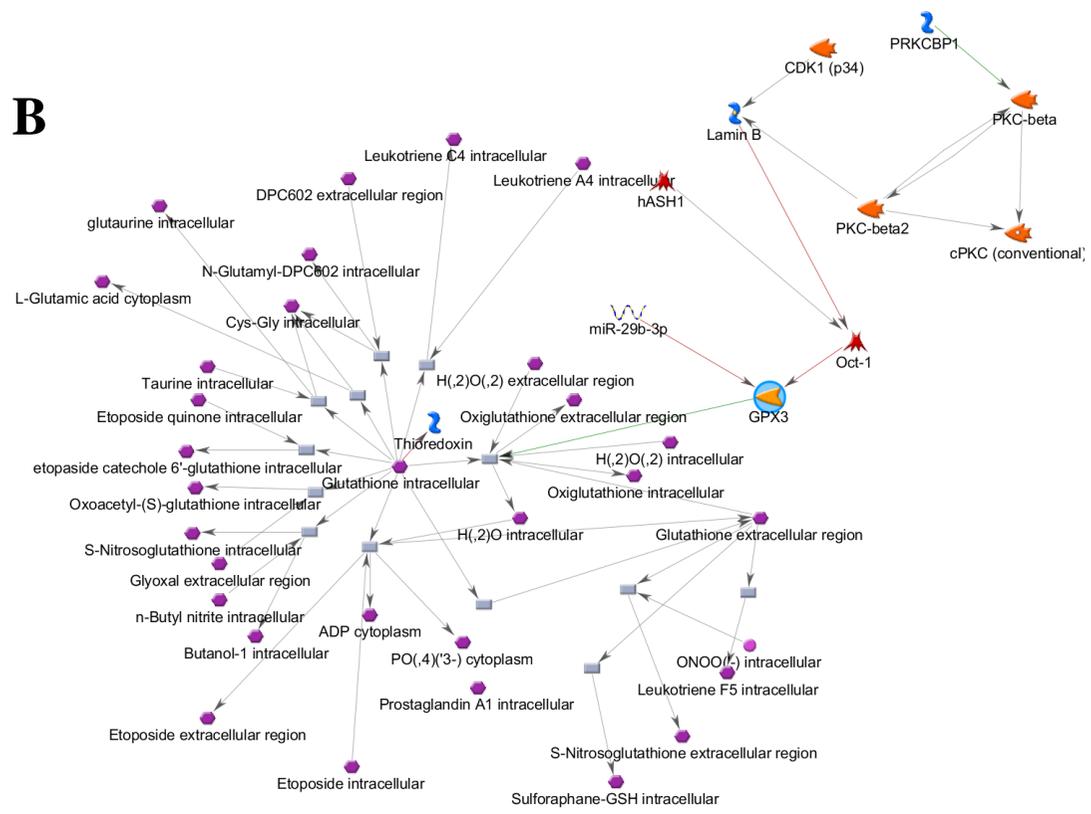


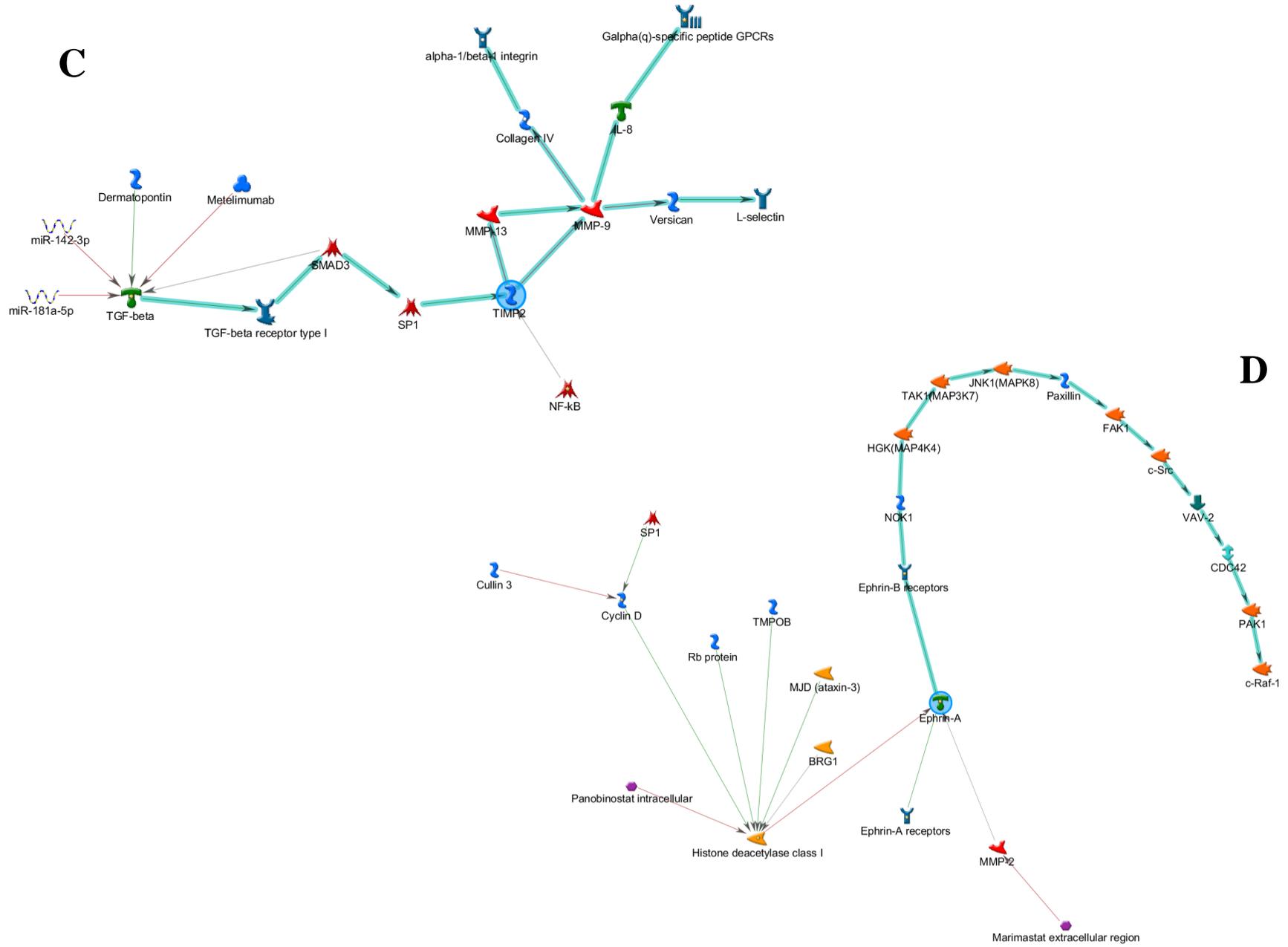
Figura 5. Modelos de regressão linear dos parâmetros seminais pós-criopreservação em função das proteínas do plasma seminal (A, B, C e D) e dos espermatozoides (E e F) de touros Guzerá. Os números dos spots referem-se aos mostrados na Figuras 1 e 2 e Tabela 3 para os *spots* dos géis de plasma seminal e Figuras 3 e 4 e Tabela 4 para os *spots* associados a proteínas espermáticas.

A

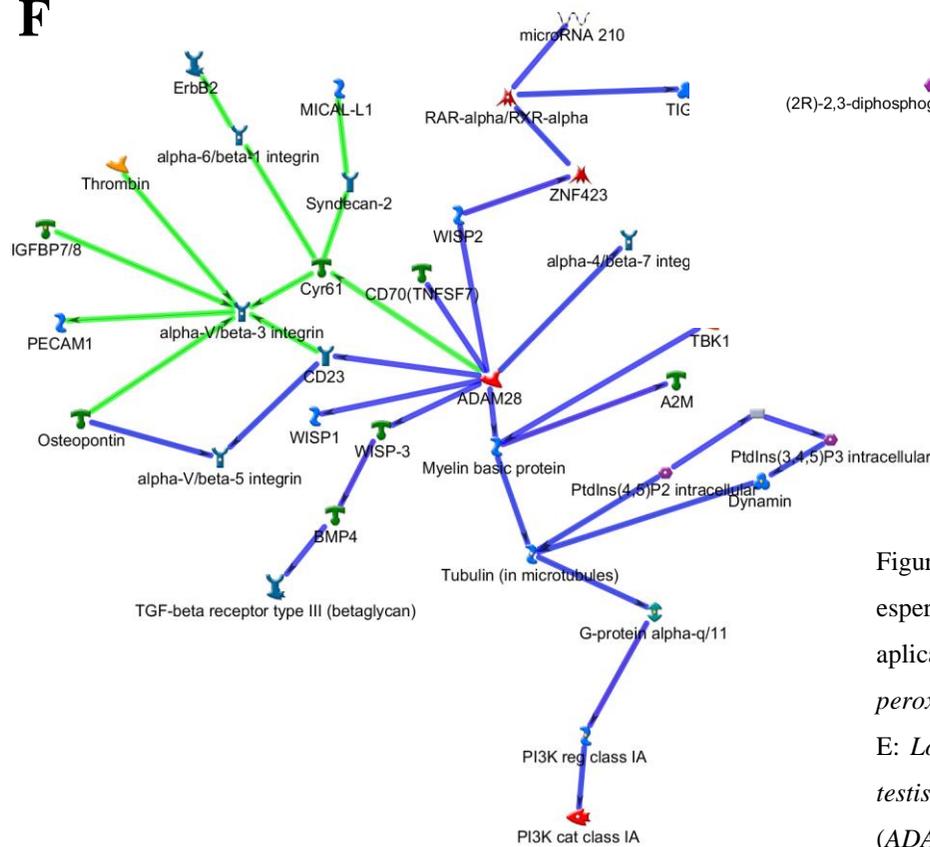


B





F



E

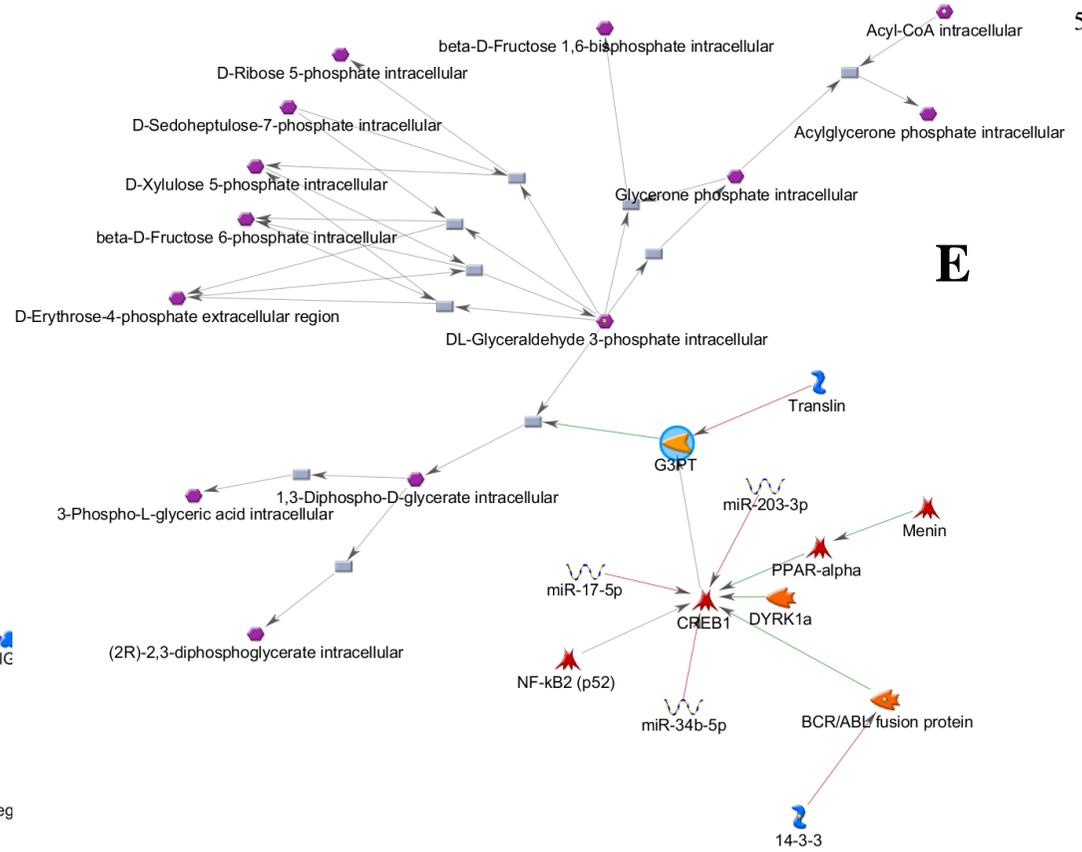


Figura 6. Análise das interações biológicas das proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides de touros Guzerá associadas com a congelabilidade do sêmen utilizando o aplicativo MetaCore (Figura 5). A: *acrosin inhibitor 1 (SPINK2)*; B: *glutathione peroxidase 3 (GPX3)*; C: *metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2)*; D: *Ephirin-A1 (EFNA1)*; E: *Low molecular weight isoform of sperm glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase testis-specific (G3PT)*; F: *Desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2 (ADAM2)*.

Proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides identificadas nos spots marcadores de diferentes regiões dos géis

Outras proteínas foram identificadas em *spots* considerados marcadores de regiões específicas dos géis 2-D do plasma seminal e dos espermatozoides. No plasma seminal, foram identificadas proteínas como *seminal plasma protein 1* e *BSP-30 kDa*, *spermadhesin-1*, *nucleobindin-1*, *heat shock 70 kDa protein*, *albumin*, *polymeric immunoglobulin receptor*, *phosphoglycerate kinase 2*, *zinc finger protein 19*, *TPA: pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like*, *coiled-coil domain-containing protein 155* (Figura 1; Tabela 3). Nos mapas 2-D dos espermatozoides, identificou-se *seminal plasma protein A3*, *BSP-30 kDa* e *seminal plasma protein PDC-109*, *alpha-enolase*, *sperm acrosome-associated protein 5*, *superoxide dismutase [Mn]*, *mitochondrial*, *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3*, *mitochondrial*, *serine racemase*, *3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase*, *mitochondrial*, *voltage-dependent anion-selective channel protein 2*, *citrate synthase*, *mitochondrial*, *leucine-rich repeat-containing protein 37A2*, *cytochrome b-c1 complex subunit 1*, *mitochondrial* (Figura 3; Tabela 4).

DISCUSSÃO

No presente estudo, descrevem-se as associações entre proteínas do plasma seminal e das células espermáticas e os parâmetros seminais pós-criopreservação de touros Guzerá criados no Nordeste do Brasil. Todos os touros apresentavam, na ocasião do estudo, *status* reprodutivo normal de acordo com a idade, mensurações de peso, circunferência escrotal (CE) e parâmetros seminais pré-criopreservação, as quais constituíam o mínimo requerido para a utilização destes animais em monta a campo (QUIRINO et al., 2004; TORRES-JUNIOR; HENRY, 2005).

Os touros formaram um grupo de animais altamente homogêneos com base nos parâmetros seminais pré-criopreservação. Assim, os grupos de alta e baixa congelabilidade foram estabelecidos de acordo com parâmetros de motilidade pós-descongelação e apresentaram também diferenças significativas com relação à cinética espermática (estimada pelo CASA), porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e espermatozoides reativos ao HOST. A grande variabilidade dos parâmetros seminais pós-descongelação indica que, apesar de possuírem semelhantes características seminais e gonádicas pré-criopreservação, alguns animais responderam de forma diferente ao processo de criopreservação do sêmen, conforme já mencionado em estudos anteriores (MARTIG et al., 1970; JOBIM et al., 2004). A capacidade do espermatozoide em sobreviver à criopreservação pode ser influenciada por uma grande diversidade de fatores, incluindo a composição do diluidor, concentração e propriedades do agente crioprotetor e protocolo de congelamento (AWAD, 2011). A avaliação do sêmen baseado no sistema computadorizado como CASA permite a aquisição de dados precisos e a identificação de pequenas variações e diferenças entre reprodutores ou tratamentos com acurácia e repetibilidade (FARRELL et al., 1995; VERSTEGEN et al., 2002). Além disso, os parâmetros de cinética espermática pós-criopreservação pelo CASA apresentam associação com a fertilidade *in vivo* de touros da raça holandesa, servindo como uma importante ferramenta para a seleção dos melhores doadores de sêmen (ZHANG et al., 1998; JANUSKAUSKAS et al., 1999; AWAD, 2011). O teste hiposmótico e a morfologia espermática confirmaram a positiva e negativa resposta dos animais à criopreservação, em acordo com a divisão dos animais em baixa e alta congelabilidade do sêmen.

As proteínas presentes no fluido do trato reprodutivo masculino são originadas dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2007b;

MOURA et al., 2010) e também de proteínas das células espermáticas liberadas da membrana plasmática (THIMON et al., 2005). No presente estudo, dois *spots* com maior expressão nos mapas 2-D do plasma seminal do grupo de alta congelabilidade foram identificados por *ESI-QUAD-ToF* como *osteopontin*, *deoxyribonuclease gamma* e *DNASE1L3*. A *osteopontin* (*OPN*) foi previamente encontrada no plasma seminal (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997) e no fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2006a), sendo positivamente associada com a fertilidade de touros da raça holandesa. A *OPN* proveniente das glândulas sexuais acessórias liga-se aos espermatozoides durante a ejaculação através das interações com as integrinas presentes na membrana espermática formando o complexo *OPN-integrin*, o qual media a interação do espermatozoide com o oócito (MOURA, 2005). A relação entre a *OPN* e a capacidade dos espermatozoides em responderem favoravelmente ao processo de criopreservação pode estar associada com as integrinas presentes na membrana espermática, onde a interação entre a *OPN* e estas moléculas conferem uma maior estabilização da membrana, evitando assim os efeitos deletérios dos procedimentos de criopreservação (JOBIM et al., 2002).

A *deoxyribonuclease gamma* e *DNASE1L3*, conhecidas como as *human DNase I-like proteins family*, estão envolvidas em atividades de *hydrolase* e *phosphatidylinositol phosphatase* (UEKI et al., 2010). A *DNase I-like proteins* foram primeiramente descritas no espermatozoide de touros quando a proteína chamada de *fertility associated-antigen* (*FAA*), altamente homóloga a esta proteína, foi descrita como indicador de maior fertilidade dos touros em sistemas de produção com monta natural (BELLIN et al., 1996; BELLIN et al., 1998). A *FAA* também foi isolada do plasma seminal e caracterizada como uma proteína com afinidade à heparina (MCCAULEY et al., 1999), além de apresentar relação com a fertilidade dos touros

utilização para inseminação artificial (SPROTT et al., 2000). A *DNase I-like proteins* estão presentes em espermatogônias e espermátocitos podendo ser responsável pelo controle do número de células iniciando a meiose através da apoptose internucleossomal de degradação do DNA (PEITSCH et al., 1993; STEPHAN et al., 1996). Diante da relação desta proteína com a fertilidade de touros e controle de passos importantes da espermatogênese como acima discutido, é sugerido que a maior expressão da *DNase I-like proteins* no grupo de alta congelabilidade pode representar uma ação desta proteína durante o processo de formação das células espermáticas, conferindo às mesmas melhor resistência após o descongelamento. Porém, novos estudos são necessários para investigar a relação desta proteína com a tolerância do espermatozoide à criopreservação.

Outros *spots* proteicos do plasma seminal, identificados como *acrosin inhibitor 1*, *glutathione peroxidase 3*, *metalloproteinase inhibitor 2*, *ephrin-A1*, *annexin A1* e *platelet-activating factor acetylhidrolase*, foram mais expressos no grupo de baixa congelabilidade. A *acrosin* é uma serino protease liberada do acrossoma durante a reação acrossômica contribuindo com o espermatozoide na transposição da zona pelúcida, enquanto a *acrisin inhibitor* constitui o fator regulador da atividade da *acrosin*, podendo evitar a fertilização (STRAUS; POLAKOSKI, 1982). A *acrosin-binding protein* foi significativamente mais expressa em ejaculados de varrões com boa resposta à criopreservação, e juntamente com a *triosephosphate isomerase*, são indicadoras potenciais da congelabilidade do sêmen nestes animais (VILAGRAN et al., 2013). No presente estudo, a *acrosin inhibitor 1* não somente foi mais expressa no plasma seminal de touros no grupo de baixa congelabilidade, mas apresentou também uma associação inversa com a motilidade espermática avaliada pelo CASA, onde cada incremento em ppm na intensidade do *spot 1* induz, potencialmente, a redução da

motilidade espermática pós-criopreservação em 0,0049 %. A função exata da *acrosin inhibitor 1* no sêmen bovino permanece desconhecida. Porém, a hipótese que explicaria a alta concentração da *acrosin inhibitor 1* no plasma seminal de bovinos com baixa tolerância à criopreservação estabelece que altas concentrações de *acrosin* são liberadas do acrossoma de espermatozoides no momento da coleta do sêmen, causando a perda de criotolerância destas células e redução da motilidade.

A *glutathione peroxidase (GPx3)* é uma enzima secretada pelo epidídimo e está presente no plasma seminal de mamíferos (CHABORY et al., 2010). Em bovinos, o epidídimo possui papel importante na proteção contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), mantendo a integridade e protegendo os espermatozoides contra os efeitos deletérios da peroxidação lipídica (BELLEANNEE et al., 2011). No presente estudo, as análises conduzidas com o aplicativo MetaCore para a *GPx3* demonstraram que esta proteína interage com as moléculas de peróxido de hidrogênio intra e extracelular, com a possível função de eliminá-las. No entanto, a *GPx3* foi identificada no *spot 8* mostrando uma associação inversa com a porcentagem de espermatozoides normais pós-criopreservação. Apesar desta enzima estar em níveis elevados no plasma seminal de touros, a sua atividade nos espermatozoides destes animais é considerada baixa em comparação com outras espécies (BILODEAU et al., 2000). A expressão da *glutathione peroxidase 3 (GPx3)* no epidídimo e no vaso deferente de camundongos é regulada por andrógenos, podendo sofrer variações na expressão da atividade neste órgão que é responsável pela redução dos defeitos espermáticos (SCHWAAB et al., 1998). Touros *Bos indicus* submetidos à insulação escrotal possuem a *GPx3* como enzima reguladora nos espermatozoides defeituosos (SHOJAEI SAADI et al., 2013). Dessa forma, a relação inversa desta enzima com a morfologia espermática pós-descongelamento pode constituir uma resposta fisiológica do próprio animal diante de um estresse oxidativo

elevado ou ainda pela menor tolerância destes espermatozoides ao estresse causado pela criopreservação.

A *platelet-activating factor acetylhydrolase (PAFA)* é uma enzima que converte a *platelet-activating factor (PAF)* para a sua forma inativa, *lyso-PAF* (STAFFORINI et al., 1997). A *PAFA* foi previamente descrita no plasma seminal de touros *Bos taurus*, garanhões e coelhos (HOUGH; PARKS, 1994), e tanto a *PAFA* quanto a *PAF* estão relacionados com a proteção espermática contra o estresse oxidativo. A *PAFA* também desempenha papel na estabilização da membrana espermática durante a criopreservação (YOSHIDA et al., 1992; JARVI et al., 1993) e é positivamente associado com a motilidade espermática em humanos e com a fertilidade em suínos (ROUDEBUSH; PURNELL, 2000; ROUDEBUSH; DIEHL, 2001). A maior expressão *PAFA* no plasma seminal de touros de baixa congelabilidade pode estar relacionada ao fato de que provavelmente animais com menor criotolerância possam ter uma menor atividade desta enzima sendo isto responsável pela diminuição da tolerância aos efeitos da criopreservação. Outros estudos são necessários para o entendimento de como a *PAFA* age no controle dos efeitos deletérios da criopreservação na membrana espermática.

As *matrix metalloproteinases (MMPs)* constituem uma família estruturalmente relacionadas às *zinc metalloendopeptidases* que atuam remodelando e degradando os componentes da matriz extracelular e participam de respostas imunogênicas, uma vez que os macrófagos, linfócitos e neutrófilos podem libertar *MMPs* de células de forma específica no plasma seminal de humanos (SHIMOKAWA KI et al., 2002). Em contrapartida, o componente capaz de regular estas endopeptidases, a *metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP-2)*, teve previamente a expressão do seu RNAm detectado nos tecidos de todas as três glândulas sexuais acessórias de touros (MCCAULEY et al., 2001), sendo mais tarde detectada a sua presença do fluido destas glândulas (MOURA et al.,

2007b). A *TIMP-2* é capaz de interagir com as *MMPs*, ligando-se a sítios catalíticos e assim regulando a atividade destas proteínas no sêmen de humanos (BUCHMAN-SHAKED et al., 2002). O estudo *in silico* sobre as interações proteína-proteína feitas pelo MetaCore, confirma a capacidade da *TIMP-2* de interagir diretamente com componentes extracelulares como as próprias *MMP9* e *MMP13* e componentes da membrana celular como receptores, integrinas e fatores de transcrição. Estando a *TIMP2* mais expressa no grupo de baixa congelabilidade e associada inversamente com integridade da membrana (HOST) e com a porcentagem de espermatozoides normais, a hipótese sugerida é que a *TIMP2* tenha sido expressa em resposta a um provável aumento da atividade das *MMPs* no plasma seminal dos animais de baixa congelabilidade associado a uma maior degradação dos componentes da membrana do espermatozoide o que contribuiria com uma redução dos parâmetros seminais deste grupo.

A *ephrin A1* é uma proteína da superfície celular (COULTHARD et al., 2012) e pertence ao sistema *Eph-Ephrin* presente em diversas células estando este sistema envolvido no desenvolvimento vascular (MCBRIDE et al., 1998), na iniciação do complexo de sinalização durante processos inflamatórios estimulando a proliferação de fibroblastos e células epiteliais, e em eventos ligados à angiogênese durante a restauração de tecidos lesionados em ratos (COULTHARD et al., 2012). Devido a participação da *ephrin A1* em processos inflamatórios, é possível que os altos níveis de *ephrin A1* possam desencadear um ataque de células do sistema imunológico sobre as células espermáticas, porém seu papel exato na fisiologia reprodutiva masculina ainda é desconhecido. Identificou-se *TIMP-2* e *ephrin A1* no *spot 13* do plasma seminal, sendo a sua expressão associada negativamente com a morfologia espermática e com a funcionalidade da membrana. É possível que tanto *TIMP-2* quanto *ephrin A1* possam

interagir com as *MMPs* na transdução de sinais através das membranas celulares (GROVES; KURIYAN, 2010), como evidenciado pela análise proteína-proteína feita pelo MetaCore. A exemplo da *acrosin inhibitor 1* descrita acima, é possível que os altos níveis de *glutathione peroxidases*, *PAFAs*, *TIMP-2* e *ephrin A1* no plasma seminal de animais classificados como sendo de baixa congelabilidade constitua uma resposta fisiológica a um possível estresse oxidativo, alto nível de *MMPs* ou ainda um possível ataque precoce de microrganismos antes mesmo do processo de criopreservação. De fato, os possíveis níveis elevados de ROS no plasma seminal do grupo de baixa congelabilidade podem contribuir para a baixa viabilidade dos espermatozoides pós-descongelamento (MAHFOUZ et al., 2010). Partindo do pressuposto de que os parâmetros seminais não diferiram entre os grupos antes da criopreservação, é possível que o sêmen de animais de baixa congelabilidade tenha sofrido um processo de estresse oxidativo inicial e silencioso, não detectado pelos exames convencionais do sêmen, tenha ocorrido precocemente, mesmo que as consequências não tenham sido detectadas durante as avaliações convencionais do sêmen pré-criopreservação. Neste sentido, as expressões destas proteínas no plasma seminal podem constituir um indicador do não sucesso da criopreservação.

No presente estudo, a *annexin A1* foi identificada tanto no plasma seminal quanto nos géis das proteínas dos espermatozoides dando ideia que esta proteína se liga fortemente com as células espermáticas após a ejaculação. Animais com piores parâmetros seminais pós-criopreservação expressam mais *annexin A1* no plasma seminal, enquanto que no grupo de alta congelabilidade a *annexin A1* foi mais intensa nos mapas proteicos dos espermatozoides. A *annexin A1* é uma proteína extracelular que, similar à *BSP1*, media o metabolismo do Ca^{2+} no espermatozoide (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; RESCHER; GERKE, 2004). As *annexin A1* presentes no plasma

seminal interagem com alta afinidade com fatores capacitantes, incluindo a heparina e outros glicosaminoglicanos (ISHITSUKA et al., 1998; IGNOTZ et al., 2007). A grande quantidade de *annexin A1* no plasma seminal pode ter submetido os espermatozoides a uma capacitação precoce, promovendo a desestabilização da membrana antes da criopreservação, fato que pode ter contribuído com a redução qualitativa dos parâmetros seminais pós-criopreservação. A *annexin A1* ligada ao espermatozoide, possui atributos importantes que norteiam o seu papel de agregação e reorganização da membrana dos espermatozoides como estar envolvida com eventos exo e/ou endocitóticos e ter a propriedade de ser Ca^+ dependente para se ligar à membrana (RESCHER; GERKE, 2004).

Seis *spots* identificados como cinco proteínas (*acrosome formation-associated factor isoform 2*, *annexin A1*, *a desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2 – ADAM 2*, *mitochondrial isoform 1 of dihydrolipoyl dehydrogenase and testis specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) apresentaram maior expressão nos mapas 2-D das proteínas dos espermatozoides de touros do grupo de alta congelabilidade. A *acrosome formation associated factor isoform 2 (Afaf)* foi encontrada abundantemente desde espermátides arredondadas até espermatozoides maduros, onde se localiza especificamente nas membranas internas e externas do acrossoma (LI et al., 2006). É possível que animais do grupo de baixa congelabilidade produzam espermatozoides com menores quantidades de *Afaf* nas membranas acrossomais, o que pode ter causado uma desestruturação do acrossoma, liberando o seu conteúdo e por fim menor tolerância aos efeitos da criopreservação e reduzida viabilidade espermática pós-descongelação. Esta hipótese corrobora com a acima mencionada em que a expressão da *acrosin inhibitor* é uma possível resposta a liberação de acrosina do acrossoma de espermatozoides de animais pertencentes ao grupo de

baixa congelabilidade provavelmente devido à baixa quantidade de *Afaf* em suas membranas.

A *ADAM 2* é uma proteína pertencente ao grupo das *non-catalytic metalloproteinase-like* presentes na superfície de membranas e envolvida na adesão das membranas plasmáticas entre gametas através da interação com as integrinas do espermatozoide e do oócito de mamíferos (WOLFSBERG et al., 1995; CHEN et al., 1999; KAJI; KUDO, 2004). A *ADAM 2*, além de ter sido mais expressa nos mapas 2-D das proteínas dos espermatozoides, apresentou uma associação direta com porcentagem de espermatozoides normais pós-criopreservação, onde o aumento de cada unidade de intensidade do *spot* em ppm induz potencial elevação da porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais em 0,0029 %. A função exata desta proteína na proteção do espermatozoide durante o processo de criopreservação ainda é desconhecida. É possível que, devido à interação com as integrinas presentes na membrana espermática (WOLFSBERG et al., 1995), a *ADAM 2* possa promover uma melhor estabilização da membrana pela formação do complexo *ADAM 2/integrinas* (CHEN et al., 1999), semelhante ao que aconteceria com a *osteopontin*, conforme discutido acima. De acordo com as interações proteína-proteína feita pelo MetaCore, a *ADAM 2* interage com a *tubulin* dos exomos dos microtúbulos, os quais podem exercer um papel de proteção à morfologia espermática, diminuindo os defeitos da cauda nos espermatozoides criopreservados.

A isoforma mitocondrial 1 da *dihydrolipoyl dehydrogenase* e a *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase testis specific* são proteínas diretamente envolvidas no metabolismo energético do espermatozoide (GOLDBERG, 1963; MUKAI; OKUNO, 2004). A *dihydrolipoyl dehydrogenase* constitui um componente mitocondrial da *pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenases* e está envolvida na hiperativação

espermática (ISHIKAWA et al., 1966). A *3-phosphate dehydrogenase testis specific* é uma enzima citoplasmática envolvida na via glicolítica requerida para a motilidade espermática e fertilidade do espermatozoide de humanos e ratos (MIKI et al., 2004). Ambas as enzimas foram identificadas em maior expressão nos mapas 2-D das proteínas dos espermatozoides dos animais pertencentes ao grupo de alta congelabilidade, fato que pode explicar a maior motilidade dos espermatozoides deste grupo. Esta hipótese é confirmada pelas análises *in silico* conduzidas com o MetaCore, onde a *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* possui uma complexa rede de interações com diversas enzimas e fatores envolvidos no metabolismo energético (BOUSSOUAR; BENAHMED, 2004). Em contrapartida, uma ressalva deve ser feita, uma vez que o *spot 26* foi também identificado como *testis specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* e foi negativamente associada com a motilidade espermática pós-criopreservação. O *spot 26* possui um peso molecular baixo (11,7 kDa) enquanto que o *spot 52*, sendo a mesma proteína, possui um peso molecular de aproximadamente 47,6 kDa. É possível que esta isoforma de baixo peso molecular da *testis specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* seja uma subunidade, ou ainda um peptídeo produto de uma proteólise ou inativação, uma vez que esta enzima presente em espermatozoides humanos exibe uma alta sensibilidade à oxidação, o que ocasiona a sua inativação constante (ELKINA et al., 2010). Dessa forma, a relação negativa da isoforma da *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* de 11,7 kDa no extrato proteico dos espermatozoides pode indicar menos isoformas 47,6 kDa intactas ocasionando uma diminuição da motilidade espermática pós-descongelação.

As proteínas identificadas em *spots* considerados marcadores de regiões específicas dos géis 2-D (kDa e pH) do plasma seminal constituem moléculas já descritas neste fluido de bovinos *Bos indicus* e/ou *Bos taurus*, como proteínas

envolvidas na capacitação espermática e na interação dos espermatozoides com o epitélio do oviduto como (*seminal plasma protein 1* e *BSP-30 kDa, spermadhesin-1*) (GWATHMEY et al., 2006; MOURA et al., 2007b). Proteínas associadas com a proteção espermática contra o estresse térmico, contra os efeitos deletérios da peroxidação lipídica, da ação de patógenos e ativação do sistema imune *heat shock 70 kDa protein, albumin, polymeric immunoglobulin receptor, zinc finger protein 19, TPA: pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like* (ALVAREZ; STOREY, 1995; HUMPHREYS et al., 1999; ANDERSON et al., 2004; BRAZDOVA et al., 2013; KAETZEL, 2013) e proteínas que interagem com os espermatozoides e podendo modular a fertilização (*nucleobindin-1* e *coiled-coil domain-containing protein 15*) (PETERSSON et al., 2004; MILARDI et al., 2012).

A análise dos géis bidimensionais com proteínas dos espermatozoides evidenciou a presença de proteínas tipicamente seminais como a *plasma protein A3 (BSP 3)*, *BSP-30 kDa (BSP 5)* e *seminal plasma protein PDC-109 (BSP 1)*, *alpha-enolase, superoxide dismutase [Mn]* (THERIEN et al., 2001; MANJUNATH; THERIEN, 2002; MOURA et al., 2007b; SOUZA et al., 2008). Estas proteínas do plasma seminal conhecido ligam-se aos espermatozoides após a ejaculação e, especificamente para o caso das *BSPs*, mesmo após sucessivas lavagens com PBS ou outros solventes, as mesmas permanecem aderidas às células, razão pela qual que são comumente detectadas em extratos proteicos de membrana espermática em várias espécies como ovinos (VAN TILBURG et al., 2013a), caprinos (VAN TILBURG et al., 2013b) e touros holandeses (Moura, resultados não publicados). Outras proteínas identificadas nos mapas 2-D dos espermatozoides estão relacionadas com eventos proteolíticos durante a reação acrossômica (*sperm acrosome-associated protein 5*) (BYRNE et al., 2012), enzimas mitocondriais envolvidas em rotas metabólicas e

produção de energia pelo espermatozoide (*ATPase family AAA domain-containing protein 3, dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 mitochondrial, Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial, citrate synthase, mitochondrial, cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial isoform 1*), proteínas e receptores que participam vias de sinalização de processos celulares (*serine racemase, voltage-dependent anion-selective channel protein 2*) (MUKAI; OKUNO, 2004; BREWIS; GADELLA, 2010; DANSHINA et al., 2010; CASTILLO et al., 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, descreve-se, no presente estudo, as associações entre proteínas do plasma seminal e espermatozoides e parâmetros espermáticos pós-criopreservação em touros Guzerá. Proteínas como a *osteopontin-K, deoxyribonuclease gamma precursor e DNASE1L3 protein* foram mais expressas no plasma seminal de touros de alta congelabilidade e podem constituir marcadores moleculares desta característica. Associações negativas entre proteínas do plasma seminal, mais abundantes em touros de baixa congelabilidade, e parâmetros espermáticos destes animais podem representar uma resposta silenciosa dos tecidos do trato reprodutivo a um estresse oxidativo precoce que não foi detectado por meio das avaliações convencionais do sêmen no pré-congelamento. Em outro aspecto, as proteínas dos espermatozoides foram, de forma geral, associadas positivamente com os parâmetros seminais pós-criopreservação. Os resultados aqui apresentados podem servir de diretrizes para futuras pesquisas que visam o desenvolvimento de diluidores e/ou a melhoria da seleção de doadores de sêmen para criopreservação.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty-acids into and peroxidative loss of fatty-acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 3, p. 334-346, Nov 1995.
- ANDERSON, G. M.; NAKADA, M. T.; DEWITTE, M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 314-320, 2004.
- AWAD, M. M. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 123, n. 3-4, p. 157-62, Feb 2011.
- BAKER, M. A. et al. The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. **Proteomics**, v. 8, n. 11, p. 2312-21, Jun 2008.
- BAKER, M. A. et al. The mouse sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. **Proteomics**, v. 8, n. 8, p. 1720-30, Apr 2008.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. **Iowa State University Press, Ames.**, v. 1 ed., 1989.
- BELLEANNÉE, C. et al. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 59-78, Jan 1 2011.
- BELLIN, M. E. et al. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 173-82, Jan 1996.
- BELLIN, M. E. et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 8, p. 2032-9, Aug 1998.
- BILODEAU, J. F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282-8, Mar 2000.
- BOUSSOUAR, F.; BENAHMED, M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 345-350, 2004.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976.
- BRAZDOVA, A. et al. Immunodominant Semen Proteins II: Contribution of Seminal Proteins to Female Immune Infertility. **Folia biologica**, v. 59, n. 5, p. 198-203, 2013.
- BREWIS, I. A.; GADELLA, B. M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 68-79, Feb 2010.
- BUCHMAN-SHAKED, O. et al. Presence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 5, p. 702-8, Sep-Oct 2002.
- BYRNE, K. et al. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **Proteomics**, v. 12, n. 23-24, p. 3559-79, Dec 2012.
- CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, Dec 1997.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, May 2004.
- CASTILLO, J.; AMARAL, A.; OLIVA, R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. **Andrology**, Dec 10 2013.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2a. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49

CHABORY, E. et al. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 4, p. 1321-31, Apr 2010.

CHEN, M. S. et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 21, p. 11830-5, Oct 12 1999.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 721-31, Oct 1 1997.

COULTHARD, M. G. et al. Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. **The American journal of pathology**, v. 181, n. 5, p. 1493-503, Nov 2012.

D'AMOURS, O. et al. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 3, p. 545-56, Mar 2010.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, May 1 2003.

DANSHINA, P. V. et al. Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 1, p. 136-145, Jan 2010.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, 1992.

ELKINA, Y. L. et al. Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Structural basis for enhanced stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 12, p. 2207-2212, 2010.

FARRELL, P. et al. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 1, p. 208-10, Jul 1995.

FINK, E. et al. Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma
Angiotensin converting enzyme in human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 247B, n. 1, p. 311-5, Feb 1989.

FURMAN, J. W.; BALL, L.; SEIDEL, G. E., JR. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 665-70, Apr 1975.

GAVIRAGHI, A. et al. Proteomics to investigate fertility in bulls. **Veterinary research communications**, v. 34 Suppl 1, p. S33-6, Jun 2010.

GOLDBERG, E. Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. **Science (New York, N.Y.)**, v. 139, n. 3555, p. 602-3, Feb 15 1963.

GONCALVES, R. F.; STAROS, A. L.; KILLIAN, G. J. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43, n. 6, p. 720-9, Dec 2008.

GONCALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alphaV and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 468-74, Feb 2007.

GROVES, J. T.; KURIYAN, J. Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 6, p. 659-65, Jun 2010.

- GWATHMEY, T. M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-7, Oct 2006.
- HAO, Y. et al. Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 2, p. 291-8, Feb 2008.
- HOUGH, S. R.; PARKS, J. E. Platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 4, p. 912-916, Apr 1994.
- HUMPHREYS, D. T. et al. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 6875-6881, Mar 12 1999.
- IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 906-13, Dec 2007.
- ISHIKAWA, E.; OLIVER, R. M.; REED, L. J. Alpha-Keto acid dehydrogenase complexes, V. Macromolecular organization of pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes isolated from beef kidney mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, n. 2, p. 534-41, Aug 1966.
- ISHITSUKA, R. et al. Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, and VI. **J Biol Chem**, v. 273, n. 16, p. 9935-41, Apr 17 1998.
- JANUSKAUSKAS, A. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 641-58, Sep 1999.
- JARVI, K. et al. Platelet-activating-factor acetylhydrolase in the male reproductive-tract - origin and properties. **International journal of andrology**, v. 16, n. 2, p. 121-127, Apr 1993.
- JOBIM, M. I. 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. 255-66, Jan 15 2004.
- JOBIM, M. I. M. et al. Albumin and osteopontin - seminal plasma proteins associated with bovine semen freezability. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v. 26, p. 296-305, 2002.
- JOBIM, M. I. M. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 765-771, Sep 1 2011.
- KAETZEL, C. S. **The Polymeric Immunoglobulin Receptor**. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2013.
- KAJI, K.; KUDO, A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 127, n. 4, p. 423-9, Apr 2004.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, Dec 1993.
- LANDI, C. et al. Towards a functional proteomics approach to the comprehension of idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, systemic sclerosis and pulmonary Langerhans cell histiocytosis. **Journal of proteomics**, v. 83, p. 60-75, May 27 2013.
- LI, Y. C. et al. Afaf, a novel vesicle membrane protein, is related to acrosome formation in murine testis. **Fabs Letters**, v. 580, n. 17, p. 4266-73, Jul 24 2006.
- MAHFOUZ, R. Z. et al. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 814-821, 2010.

- MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of reproductive immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 109-19, Jan 2002.
- MARTIG, R. C.; ALMQUIST, J. O.; FOSTER, J. Reproductive capacity of beef bulls. V. Fertility and freezability of successive ejaculates collected by different methods. **Journal of Animal Science**, v. 30, n. 1, p. 60-2, Jan 1970.
- MARTINEZ-HEREDIA, J. et al. Proteomic identification of human sperm proteins. **Proteomics**, v. 6, n. 15, p. 4356-69, Aug 2006.
- MARTINS, J. A. M. et al. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 115-127, June 2013 2013.
- MCCAULEY, T. C. et al. Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, n. 2, p. 145-53, Oct 1999.
- MCCAULEY, T. C. et al. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 3, p. 336-341, Mar 2001.
- MIKI, K. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 47, p. 16501-6, Nov 23 2004.
- MILARDI, D. et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, p. 67-73.e1, 2012.
- MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 3-10, Jan-Mar 2005.
- MOURA, A. A. et al. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 534-541, Jul-Aug 2006.
- MOURA A. A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, Apr 2007.
- MOURA, A. A. et al. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, Sep 10 2010.
- MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 2, p. 540-7, Aug 2004.
- NAGASE, H. et al. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. **5th International Congress Animal Reproduction A.I., 1964.**, v. 4, p. 410-415, 1964.
- PEDDINTI, D. et al. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC systems biology**, v. 2, p. 19, 2008.
- PEITSCH, M. C. et al. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). **The EMBO journal**, v. 12, n. 1, p. 371-7, Jan 1993.
- PETERSSON, U. et al. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. **Bone**, v. 34, n. 6, p. 949-60, Jun 2004.
- QUIRINO, C. R. et al. Genetic parameters of libido in Brazilian Nelore bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 1-7, 2004.

RÊGO, J. P. A. Análise proteômica do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês adultos. **Universidade Federal do Ceará. Pós-Graduação em Zootecnia (Dissertação de Mestrado)**, p. 109, 2010.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2631-9, Jun 1 2004.

ROUDEBUSH, W. E.; DIEHL, J. R. Platelet-activating factor content in boar spermatozoa correlates with fertility. **Theriogenology**, v. 55, n. 8, p. 1633-1638, May 1 2001.

ROUDEBUSH, W. E.; PURNELL, E. T. Platelet-activating factor content in human spermatozoa and pregnancy outcome. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 2, p. 257-260, Aug 2000.

SCHWAAB, V. et al. GPx3: The plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 4, p. 362-372, Dec 1998.

SHIMOKAWA KI, K. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 1, p. 32-6, Jan 2002.

SHOJAEI SAADI, H. A. et al. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal of proteomics**, v. 82, p. 64-80, Apr 26 2013.

SOUZA, C. E. A. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim Reprod Sci**, v. 105, n. 1-2, p. 72-89, Apr 2008.

SPROTT, L. R. et al. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 4, p. 795-8, Apr 2000.

SRIVASTAVA, N. et al. Sequestration of PDC-109 protein improves freezability of crossbred bull spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 131, n. 1-2, p. 54-62, Mar 2012.

STAFFORINI, D. M. et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 17895-17898, Jul 18 1997.

STEPHAN, H. et al. Distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis. **Histochemistry and cell biology**, v. 106, n. 4, p. 383-93, Oct 1996.

STRAUS, J. W.; POLAKOSKI, K. L. Acrosin inhibition. Comparisons of membrane-associated and -solubilized enzyme. **J Biol Chem**, v. 257, n. 14, p. 7962-4, Jul 25 1982.

THERIEN, I.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 41-51, Jul 2001.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 4, p. 768-76, Oct 1998.

_____. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 3, p. 590-8, Sep 1999.

THIMON, V. et al. Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 5, p. 881-90, Nov 2005.

TORRES-JUNIOR, J. R. S.; HENRY, M. Sexual development of Guzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 114-121, Apr-Jun 2005.

UEKI, M. et al. Genetic and expression analysis of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease I-like 1 and 2 genes. **Electrophoresis**, v. 31, n. 12, p. 2063-2069, 2010.

VAN TILBURG, M. F. et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1247-61, Jun 2013.

VAN TILBURG, M. F. et al. Variations in the protein profile of membrane-rich fractions of Saanen buck spermatozoa during dry and rainy seasons in Brazilian Northeast **In: 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**, v. 10, n. 3, 2013.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-79, Jan 1 2002.

VILAGRAN, I. et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. **Theriogenology**, v. 80, n. 5, p. 443-50, Sep 15 2013.

WOLFSBERG, T. G. et al. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **The Journal of cell biology**, v. 131, n. 2, p. 275-8, Oct 1995.

YOSHIDA, H.; SATOH, K.; IMAIZUMI, T. Activity of platelet-activating-factor acetylhydrolase exists in red-cell membrane. **American Journal of Hematology**, v. 40, n. 1, p. 61-63, May 1992.

ZHANG et al. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 207-216, 1998.

ZHANG, X. Z.; XIONG, C. L. [Proteins in sperm and seminal plasma associated with human sperm resistance to cryopreservation]. **Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology**, v. 19, n. 3, p. 214-7, Mar 2013.

Tabela 3. Proteínas do plasma seminal de touros Guzerá. As proteínas representam aquelas identificadas nos *spots* diferencialmente expressos e associadas aos parâmetros seminais pós-criopreservação nos grupos de alta e baixa congelabilidade e aquelas identificadas nos *spots* marcadores de diferentes regiões dos géis 2-D. Os números dos *spots* se referem aos mostrados nas Figuras 1 e 2. As proteínas foram identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (*ESI-QUAD-ToF*).

Proteína	kDa/pI Experimentais	Número de acesso Swissprot/NCBI nr	Escore da proteína MS/MS	Sequencia coberta (%)	Peptídeo pareado	Escore do íon
<i>Acrosin inhibitor 1 (Bos taurus)</i>						
<i>Spot</i> 01	19,7/3,2	IAC1_BOVIN	27	30%	⁽¹⁶⁾ K,VYTEACTR,E ⁽²³⁾	04
					⁽²⁴⁾ R,EYNPICDSAAK,T ⁽³⁴⁾	27
<i>Osteopontin-K (Bos taurus)</i>						
<i>Spot</i> 02	21,6/4,6	OSTK_BOVIN	166	12%	⁽²²⁶⁾ K,HSNLIESQENSK,L ⁽²³⁷⁾	60
					⁽²³⁸⁾ K,LSQEFHSLEDK,L ⁽²⁴⁸⁾	53
					⁽²⁶⁵⁾ R,ISHELDSASSEVN ⁽²⁷⁷⁾	28
					⁽²⁶⁵⁾ R,ISHELDSASSEVN ⁽²⁷⁷⁾	04
					⁽²⁶⁵⁾ R,ISHELDSASSEVN ⁽²⁷⁷⁾	44
					⁽²⁶⁵⁾ R,ISHELDSASSEVN ⁽²⁷⁷⁾	53
<i>Spot</i> 04	24,3/4,5	OSTK_BOVIN	90	8%	⁽²³⁸⁾ K,LSQEFHSLEDK,L ⁽²⁴⁸⁾	49

					(265)R,ISHELDSASSEVN ⁽²⁷⁷⁾	41
<i>Coiled-coil domain-containing protein 155 (Ovis aries)</i>						
Spot 03	20,7/4,1	426243137	55	01%	(444)R,VGDWLPR,R ⁽⁴⁵⁰⁾	27
					(444)R,VGDWLPR,R ⁽⁴⁵⁰⁾	29
					(444)R,VGDWLPR,R ⁽⁴⁵⁰⁾	27
<i>Seminal plasma protein BSP-30 kDa (Bos taurus)</i>						
Spot 05	30,1/4,1	SFP4_BOVIN	68	12%	(138)R,DEPECVFPFIYR,K ⁽¹⁴⁹⁾	35
					(167)R,WCSLTSNYDR,D ⁽¹⁷⁶⁾	33
<i>Spermadhesin-1 (Bos taurus)</i>						
Spot 06	10,5/4,8	SPAD1_BOVIN	222	29%	(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	66
					(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	50
					(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	19
					(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	70
					(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	44
					(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	38
					(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	70

(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	72
(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	31
(36) K,EESGVIATYYGPK,T ⁽⁴⁸⁾	45
(77)K,ESLEIIDGLPGSPVLGK,I ⁽⁹³⁾	36
(77)K,ESLEIIDGLPGSPVLGK,I ⁽⁹³⁾	60
(77)K,ESLEIIDGLPGSPVLGK,I ⁽⁹³⁾	52
(77)K,ESLEIIDGLPGSPVLGK,I ⁽⁹³⁾	26
(94)K,ICEGSLMDYR,S ⁽¹⁰³⁾	91

Seminal plasma protein PDC-109 (Bos taurus)

<i>Spot 07</i>	14,0/6,0	SFP1_BOVIN	267	38%	(60)K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR, W ⁽⁸²⁾	88
					(60)K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR, W ⁽⁸²⁾	71
					(60)K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR, W ⁽⁸²⁾	62
					(60)K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,	72

W ⁽⁸²⁾	
⁽⁶⁰⁾ K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,	63
W ⁽⁸²⁾	
⁽⁶⁰⁾ K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,	83
W ⁽⁸²⁾	
⁽⁶⁰⁾ K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,	65
W ⁽⁸²⁾	
⁽⁶⁰⁾ K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,	58
W ⁽⁸²⁾	
⁽⁶⁰⁾ K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,	78
W ⁽⁸²⁾	
⁽⁶⁰⁾ K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,	28
W ⁽⁸²⁾	
⁽⁹⁴⁾ K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	31
⁽⁹⁴⁾ K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	31
⁽⁹⁴⁾ K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	31

					(⁹⁴)K,CVF ⁽¹⁰³⁾ PF ⁽¹⁰³⁾ YGGK,K	29
					(⁹⁴)K,CVF ⁽¹⁰³⁾ PF ⁽¹⁰³⁾ YGGK,K	33
					(⁹⁴)K,CVF ⁽¹⁰³⁾ PF ⁽¹⁰³⁾ YGGK,K	29
					(⁹⁴)K,CVF ⁽¹⁰³⁾ PF ⁽¹⁰³⁾ YGGK,K	42
					(¹¹¹)K,IGSMWMSWCSLSPNYDK,D (¹²⁷)	104
					(¹¹¹)K,IGSMWMSWCSLSPNYDKDR,A	75
					(¹²⁹)	
<hr/>						
<i>Glutathione peroxidase 3 (Bos taurus)</i>						
Spot 08	24,3/6,4	GPX3_BOVIN	73	8%	(¹⁸⁶)K,FLVGPDGIPIMR,W (¹⁹⁷)	37
					(²⁰⁹)K,MDILTYMR,R (²¹⁶)	35
<hr/>						
<i>Seminal plasma protein A3 (Bos taurus)</i>						
Spot 09	13,2/6,7	SFP3_BOVIN	47	10%	(⁵⁴)K,CVF ⁽⁶³⁾ PF ⁽⁶³⁾ YGNK,K	24
					(⁵⁴)K,CVF ⁽⁶³⁾ PF ⁽⁶³⁾ YGNK,K	23
<hr/>						
<i>Metalloproteinase inhibitor 2 (Bos taurus)</i>						
Spot 10	24,0/6,9	TIMP2_BOVIN	45	6%	(⁵⁴)K,EVDSGNDIYGNPIK,R (⁶⁷)	28
					(⁵⁴)K,EVDSGNDIYGNPIKR,I (⁶⁸)	17

<i>Spot 13</i>	25,0/8,8	TIMP2_BOVIN	121	6%	⁽⁵⁴⁾ K, EVDSGNDIYGNPIK, R ⁽⁶⁷⁾	73
<i>Zinc finger protein 19 (Bos taurus)</i>						
<i>Spot 11</i>	11,6/9,8	ZNF19_BOVIN	24	3%	⁽⁰⁸⁾ K, VWHQEVVTFEDVAVYFTR, T ⁽²⁵⁾	24
<i>TPA: pancreatic adenocarcinoma upregulated factor-like (Bos taurus)</i>						
<i>Spot 12</i>	11,5/9,7	296473587	253	32%	⁽²⁴⁾ R, GGGSYFSTTK, D ⁽³³⁾	23
					⁽³⁴⁾ K, DNENEITGIR, V ⁽⁴³⁾	53
					⁽³⁴⁾ K, DNENEITGIR, V ⁽⁴³⁾	60
					⁽⁴⁴⁾ R, VFIGIGGIK, S ⁽⁵³⁾	19
					⁽⁵⁴⁾ K, EVDSGNDIYGNPIKR, I ⁽⁶⁸⁾	49
					⁽⁵⁴⁾ K, EVDSGNDIYGNPIKR, I ⁽⁶⁸⁾	39
					⁽¹⁰⁸⁾ R, GGGSYFSTTK, D ⁽¹¹⁷⁾	49
					⁽¹⁰⁹⁾ K, ATFGENSGR, S ⁽¹¹⁷⁾	59
					⁽¹¹⁸⁾ R, SFSAFPDGSEK, V ⁽¹²⁸⁾	44
<i>Ephrin-A1 (Bos taurus)</i>						
<i>Spot 13</i>	25,0/8,8	EFNA1_BOVIN	98	9%	⁽³²⁾ K, FWNEDYTVHVR, I ⁽⁴²⁾	53
					⁽³²⁾ K, FWNEDYTVHVR, I ⁽⁴²⁾	68

					(111)R,FTGFTLSK,D ⁽¹¹⁸⁾	23
<i>Annexin A1 (Bos taurus)</i>						
<i>Spot 14</i>	38,3/6,8	ANXA1_BOVIN	414	29%	(30)K,GGPGSAVSPYPTFNPSSDVEALHK, A ⁽⁵³⁾	33
					(59)K,GVDEATHIIEILTK,R ⁽⁷¹⁾	68
					(89)K,GKPLDEVLK,K ⁽⁹⁷⁾	23
					(114)K,TPAQFDAEELR,A ⁽¹²⁴⁾	56
					(129)K,GLGTDEDTLNEILASR,T ⁽¹⁴⁴⁾	97
					(167)K,DIASDTSGDYEK,A ⁽¹⁷⁸⁾	47
					(189)R,SEELAVNDDLADSDAR,A ⁽²⁰⁴⁾	90
<i>Clusterin (Bos taurus)</i>						
<i>Spot 15</i>	40,0/5,6	CLUS_BOVIN	512	19%	(24)K,ELQEMSTEGSK,Y ⁽³⁴⁾	44
					(52)K,TQIEQTNEER,K ⁽⁶¹⁾	56
					(62)R,KLLSSLEEAK,K ⁽⁷²⁾	64
					(63)R,LLSSLEEAK,K ⁽⁷²⁾	54
					(63)K,LLSSLEEAK,K ⁽⁷²⁾	45

(153)R,IDSLMENDR,E ⁽¹⁶¹⁾	29
(153)R,IDSLMENDR,E ⁽¹⁶¹⁾	62
(153)R,IDSLMENDR,E ⁽¹⁶¹⁾	62
(153)R,IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFT	49
R,A ⁽¹⁷⁶⁾	
(162)R,EQSHVMDVMEDSFTR,A ⁽¹⁷⁶⁾	24
(162)R,EQSHVMDVMEDSFTR,A ⁽¹⁷⁶⁾	60
(177)R,ASSIMDELFQDR,F ⁽¹⁸⁸⁾	21
(177)R,ASSIMDELFQDR,F ⁽¹⁸⁸⁾	31
(177)R,ASSIMDELFQDR,F ⁽¹⁸⁸⁾	37
(177)R,ASSIMDELFQDR,F ⁽¹⁸⁸⁾	45
(177)R,ASSIMDELFQDR,F ⁽¹⁸⁸⁾	45
(177)R,ASSIMDELFQDR,F ⁽¹⁸⁸⁾	35
(177)R,ASSIMDELFQDR,F ⁽¹⁸⁸⁾	94
(259)R,TPYHFPTMEFTENNDR,T ⁽²⁷⁴⁾	29
(259)R,TPYHFPTMEFTENNDR,T ⁽²⁷⁴⁾	9

Heat shock 70 kDa protein (*Bos taurus*)

Spot 16	63,4/5,2	HSP13_BOVIN	73	2%	⁽¹⁰⁶⁾ K,VFTPEELEAEIGR, ⁽¹¹⁸⁾ Y	73
---------	----------	-------------	----	----	--	----

Nucleobindin-1 (*Bos taurus*)

Spot 16	63,4/5,2	NUCB1_BOVIN	434	24%	⁽⁶⁹⁾ K,LQAANAEDIK, ⁽⁷⁸⁾ S	46
					⁽⁸⁵⁾ R,ELDFVSHHVR, ⁽⁹⁴⁾ T	60
					⁽¹¹⁶⁾ K,MDAQQEPNIQLDHLNLLK, ⁽¹³³⁾ Q	26
					⁽¹⁵⁰⁾ R,DLELLIQTATR, ⁽¹⁶⁰⁾ D	58
					⁽¹⁵⁰⁾ R,DLELLIQTATR, ⁽¹⁶⁰⁾ D	26
					⁽¹⁸⁷⁾ R,YLESLGEEQR, ⁽¹⁹⁶⁾ K	21
					⁽²¹⁶⁾ K,VNVPGSQAQLK, ⁽²²⁶⁾ E	13
					⁽²⁷⁸⁾ K,NEDDDMREMEER, ⁽²⁹⁰⁾ L	41
					⁽²⁷⁸⁾ K,NEDDDMREMEER, ⁽²⁹⁰⁾ L	37
					⁽³⁰⁸⁾ R,LVTLEEFLASTQR, ⁽³²⁰⁾ K	72
					⁽³⁶³⁾ R,RFEEELAAR, ⁽³⁷¹⁾ E	35
					⁽³⁶³⁾ R,RFEEELAAR, ⁽³⁷¹⁾ E	28
					⁽³⁶⁴⁾ R,FEEELAAR, ⁽³⁷¹⁾ E	44

(382)R,LSQETEALGR,S (391) 19

Serum albumin (Bos taurus)

Spot 17	75,3/6,5	ALBU_BOVIN	525	18%	(35)R,FKDLGEEHFK,G (44)	43
					(37)K,DLGEEHFK,G (44)	11
					(66)K,LVNELTEFAK,T (75)	42
					(66)K,LVNELTEFAK,T (75)	33
					(66)K,LVNELTEFAK,T (75)	20
					(66)K,LVNELTEFAK,T (75)	38
					(169)R,HPYFYAPPELLYYANK,Y (183)	22
					(169)R,HPYFYAPPELLYYANK,Y (183)	29
					(319)K,DAIPENLPPLTADFAEDK,D (336)	38
					(347)K,DAFLGSFLYEYSR,R (359)	19
					(347)K,DAFLGSFLYEYSR,R (359)	73
					(347)K,DAFLGSFLYEYSR,R (359)	68
					(347)K,DAFLGSFLYEYSR,R (359)	78
					(360)R,RHPEYAVSVLLR,L (371)	38

(402)K,HLVDEPQNLIK,Q ⁽⁴¹²⁾	42
(437)R,KVPQVSTPTLVEVSR,S ⁽⁴⁵¹⁾	50
(438)K,VPQVSTPTLVEVSR,S ⁽⁴⁵¹⁾	74
(548)K,KQTALVELLK,H ⁽⁵⁵⁷⁾	37
(54)K,QTALVELLK,H ⁽⁵⁵⁷⁾	43

Platelet-activating factor acetylhydrolase (Bos taurus)

Spot 18	62,2/6,8	PAFA_BOVIN	252	12%	(211)K,RGEEEFPLR,N ⁽²¹⁹⁾	46
					(212)R,GEEEFPLR,N ⁽²¹⁹⁾	53
					(311)R,IPQPLFFINSER,F ⁽³²²⁾	72
					(323)R,FQYPSNIIR,M ⁽³³¹⁾	39
					(349)R,GSVHQNFVDFTFATSK,I ⁽³⁶⁴⁾	22
					(365)K,IIGYLFTLK,G ⁽³⁷³⁾	21

Polymeric immunoglobulin receptor (Bos taurus)

Spot 19	115,3/8,7	PIGR_BOVIN	114	1%	(20)K,SPIFGPEEVTSVEGR,S ⁽³⁴⁾	114
---------	-----------	------------	-----	----	---	-----

Phosphoglycerate kinase 2 (Equus caballus)

<i>Spot 20</i>	57,6/9,1	PGK2_HORSE	152	16%	⁽²⁰⁰⁾ K,ALENPERPFLAILGGAK,V ⁽²¹⁶⁾	17
					⁽²⁰⁰⁾ K,ALENPERPFLAILGGAK,V ⁽²¹⁶⁾	17
					⁽²³¹⁾ K,VNEMIIGGGMAYTFLK,V ⁽²⁴⁶⁾	33
					⁽²⁴⁷⁾ K,VLNNMEIGASLFDEEGAK,I ⁽²⁶⁴⁾	73
					⁽³⁸⁹⁾ K,VSHVSTGGGASLELLEGGK,I ⁽⁴⁰⁶⁾	11
					⁽³⁸⁹⁾ K,VSHVSTGGGASLELLEGGK,I ⁽⁴⁰⁶⁾	29
<i>Spot 21</i>	58,0/9,6	PGK2_HORSE	143	17%	⁽²³⁾ R,VDFNVPMKK,N ⁽³¹⁾	10
					⁽⁷⁶⁾ K,YSLEPVAAELK,S ⁽⁸⁶⁾	34
					⁽²⁰⁰⁾ K,ALENPERPFLAILGGAK,V ⁽²¹⁶⁾	28
					⁽²⁴⁷⁾ K,VLNNMEIGASLFDEEGAK,I ⁽²⁶⁴⁾	41
					⁽³⁸⁹⁾ K,VSHVSTGGGASLELLEGGK,I ⁽⁴⁰⁶⁾	29

Deoxyribonuclease gamma precursor (Bos taurus)

<i>Spot 22</i>	67,4/9,9	329664474	357	23%	⁽⁵²⁾ R,CDIILLMEIK,D ⁽⁶¹⁾	30
					⁽⁸¹⁾ R,KGITYNYVISSR,L ⁽⁹²⁾	88
					⁽⁸²⁾ K,GITYNYVISSR,L ⁽⁹²⁾	07

(100)K,EQYAFLYK,E ⁽¹⁰⁷⁾	36
(148)K,DFVIVPLHTTPETSVR,E ⁽¹⁶³⁾	55
(148)K,DFVIVPLHTTPETSVR,E ⁽¹⁶³⁾	26
(148)K,DFVIVPLHTTPETSVR,E ⁽¹⁶³⁾	68
(164)R,EIDELADVYTDVK,R ⁽¹⁷⁶⁾	61
(268)K,ALDVSDHFPVEFK,L ⁽²⁸⁰⁾	1
(268)K,ALDVSDHFPVEFK,L ⁽²⁸⁰⁾	66

DNASE1L3 protein (Bos taurus)

<i>Spot 22</i>	67,4/9,9	154757658	356	24%	(52)R,CDIILLMEIK,D ⁽⁶¹⁾	30
					(81)R,KGITYNYVISSR,L ⁽⁹²⁾	88
					(82)K,GITYNYVISSR,L ⁽⁹²⁾	07
					(100)K,EQYAFLYK,E ⁽¹⁰⁷⁾	36
					(148)K,DFVIVPLHTTPETSVR,E ⁽¹⁶³⁾	55
					(148)K,DFVIVPLHTTPETSVR,E ⁽¹⁶³⁾	26
					(148)K,DFVIVPLHTTPETSVR,E ⁽¹⁶³⁾	68
					(164)R,EIDELADVYTDVK,R ⁽¹⁷⁶⁾	61

⁽²⁶⁸⁾ K,ALDVSDHFPVEFK,L ⁽²⁸⁰⁾	01
⁽²⁶⁸⁾ K,ALDVSDHFPVEFK,L ⁽²⁸⁰⁾	66

Tabela 4. Proteínas totais dos espermatozoides de touros Guzerá. As proteínas representam aquelas identificadas nos *spots* diferencialmente expressos e associados aos parâmetros seminais pós-criopreservação nos grupos de alta e baixa congelabilidade e aquelas identificadas nos *spots* marcadores de diferentes regiões dos géis 2-D. Os números dos *spots* se referem aos mostrados nas Figuras 3 e 4. As proteínas foram identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (*ESI-QUAD-ToF*).

Proteína	kDa/pI Experimentais	Número de acesso Swissprot/NCBI nr	Escore da proteína MS/MS	Sequencia coberta (%)	Peptídeo pareado	Escore do íon
<i>Seminal plasma protein A3 (Bos taurus)</i>						
<i>Spot 23</i>	12,0/5,0	SFP3_BOVIN	50	14%	⁽⁵⁴⁾ K,CVFPPFIYGNK,K ⁽⁶³⁾	24
					⁽⁵⁴⁾ K,CVFPPFIYGNK,K ⁽⁶³⁾	28
					⁽⁹⁹⁾ K,CVFPPFIYEGK,S ⁽¹⁰⁸⁾	22
<i>Spot 33</i>	18,9/4,6	SFP3_BOVIN	31	14%	⁽⁵⁴⁾ K,CVFPPFIYGNK,K ⁽⁶³⁾	13
					⁽⁹⁹⁾ K,CVFPPFIYEGK,S ⁽¹⁰⁸⁾	31
<i>Sperm acrosome-associated protein 5 (Bos taurus)</i>						
<i>Spot 24</i>	12,4/5,4	LYZL5_BOVIN	79	13%	⁽²⁹⁾ K,KLEAAGLNGFK,G ⁽³⁹⁾	64

(104) R,HILDDIMCAK,K⁽¹¹³⁾ 16

Seminal plasma protein PDC-109 (Bos taurus)

Spot 25	13,7/5,2	SFP1_BOVIN	243	39%	(59)R,KHFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,W ⁽⁸²⁾	51
					(59)R,KHFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,W ⁽⁸²⁾	49
					(60)K,HFDCTVHGSLFPWCSLDADYVGR,W ⁽⁸²⁾	47
					(94)K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	30
					(94)K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	31
					(94)K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	31
					(94)K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	31
					(94)K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	30
					(94)K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	39
					(94)K,CVFPIYGGK,K ⁽¹⁰³⁾	31
					(111)K,IGSMWMSWCSLSPNYDK,D ⁽¹²⁷⁾	34
					(111)K,IGSMWMSWCSLSPNYDKDR,A ⁽¹²⁹⁾	73

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific (Bos taurus)

Spot 26	11,7/7,8	G3PT_BOVIN	142	16%	(62)R,ELIVGINGFGR,I ⁽⁷²⁾	40
---------	----------	------------	-----	-----	-------------------------------------	----

					(168)K,AHIEAGAQR,V (176)	33
					(177)R,VVICAPSPDAPMFVMGVNEK,E (196)	3
					(294) R,VPTPDVSVVDLTCR,L (307)	25
					(358)K,AGIALNDNFVK,L (368)	29
					(358)K,AGIALNDNFVK,L (368)	40
					(358)K,AGIALNDNFVK,L (368)	12
Spot 52	47,6/7,9	110626121	88	7%	(327)K,GPMAGILAYTEDEVVSTDFLSDTHSSIFD	88
					AK,A (357)	
<hr/>						
<i>Seminal plasma protein BSP-30 kDa (Bos taurus)</i>						
Spot 27	13,0/8,6	SFP4_BOVIN	74	15%	(138)R,DEPECVFPFIYR,K (149)	35
					(159)R,VHSFFWR,R (165)	12
					(167)R,WCSLTSNYDR,D (176)	27
<hr/>						
<i>AT-rich interactive domain-containing protein 5A (Bos taurus)</i>						
Spot 28	12,1/9,2	ARI5A_BOVIN	26	01%	(96)K,LGAYELVTGRR,L (106)	26
<hr/>						
<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (Bos taurus)</i>						
Spot 29	21,3/8,4	SODM_BOVIN	71	10%	(54)K,HHAAAYVNNLNVAEEK,Y (68)	49

					(⁵⁴)K,HHAAAYVNNLNVAEEK,Y (⁶⁸)	42
					(¹⁹⁵)K,NVRPDYLK,A (²⁰²)	22
Spot 30	20,4/7,5	SODM_BOVIN	49	10%	(⁵⁴)K,HHAAAYVNNLNVAEEK,Y (⁶⁸)	34
					(¹⁹⁵)K,NVRPDYLK,A (²⁰²)	15
<hr/>						
<i>ATPase family AAA domain-containing protein 3 (Bos taurus)</i>						
Spot 31	18,3/6,0	ATAD3_BOVIN	24	2%	(⁹⁴)K,EYEAAVEQLK,G(¹⁰³)	24
<hr/>						
<i>Outer dense fiber protein 2 (Bos taurus)</i>						
Spot 32	18,0/5,2	ODFP2_BOVIN	78	1%	(⁶²⁴)K,NIDLTAISDLR,S (⁶³⁵)	78
Spot 33	18,9/4,6	ODFP2_BOVIN	77	1%	(⁶²⁴)K,NIDLTAISDLR,S (⁶³⁵)	77
Spot 37	23,2/5,7	ODFP2_BOVIN	65	3%	(⁴⁹⁷)R,QTAEYSAFK,L(⁵⁰⁵)	34
					(⁵⁵⁵)R,LEADEVAAQLER,C(⁵⁶⁶)	52
<hr/>						
<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial (Bos taurus)</i>						
Spot 37	23,2/5,7	NDUS3_BOVIN	65	09%	(¹¹²)K,SLADLTAVDIPTR,Q(¹²⁴)	43
					(¹²⁸)R,FEIVYNLLSLR,F(¹³⁸)	38
<hr/>						
<i>Serine racemase (Bos taurus)</i>						
Spot 34	22,4/4,3	SRR_BOVIN	59	4%	(²⁵⁴)R,DLVDDVFTVTEDEIK,Y(²⁶⁸)	59
<hr/>						

Acrosome formation-associated factor isoform 2 (Bos taurus)

<i>Spot 35</i>	23,5/4,1	297467259	84	3%	⁽¹¹⁴⁾ R,ATTDLNFSLR,N ⁽¹²³⁾	84
<i>Spot 36</i>	25,6/4,1	297467259	84	3%	⁽¹¹⁴⁾ R,ATTDLNFSLR,N ⁽¹²³⁾	84

3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial (Bos taurus)

<i>Spot 38</i>	27,3/6,0	3HIDH_BOVIN	95	15%	⁽⁷⁷⁾ K,EFLDAGEQVVSSPADVAEK,A ⁽⁹⁵⁾	20
					⁽¹²⁶⁾ K,GSLIDSSTIDPMVSK,E ⁽¹⁴¹⁾	27
					⁽¹⁵⁰⁾ K,MGAVFMDAPVSGGVGAAR,S ⁽¹⁶⁷⁾	48

Annexin A1 (Bos taurus)

<i>Spot 39</i>	23,3/6,7	ANXA1_BOVIN	196	22%	⁽⁵⁹⁾ K,GVDEATIEILTK,R ⁽⁷¹⁾	81
					⁽¹²⁹⁾ K,GLGTDEDTLNEILASR,T ⁽¹⁴⁴⁾	27
					⁽¹⁸⁹⁾ R,SEELAVNDDLADSDAR,A ⁽²⁰⁴⁾	117
					⁽²⁰⁵⁾ R,ALYEAGER,R ⁽²¹²⁾	28
					⁽²⁵¹⁾ K,VLDLELK,G ⁽²⁵⁷⁾	17
					⁽³⁰⁴⁾ R,SEIDMNDIK,A ⁽³¹²⁾	28
					⁽³³⁸⁾ K,ILVALCGRD ⁽³⁴⁶⁾	20
<i>Spot 40</i>	28,9/7,7	ANXA1_BOVIN	314	35	⁽⁵⁹⁾ K,GVDEATIEILTK,R ⁽⁷¹⁾	82

					(⁸⁹)K,GKPLDEVLK,K(⁹⁷)	23
					(⁸⁹)K,GKPLDEVLKK,A(⁹⁸)	38
					(⁹⁹)K,ALLGHLEEVVLALLK,T(¹¹³)	10
					(⁹⁹)K,ALLGHLEEVVLALLK,T(¹¹³)	60
					(¹¹⁴)K,TPAQFDAEELR,A(¹²⁴)	18
					(¹⁶⁷)K,DIASDTSGDYEK,A(¹⁷⁸)	59
					(¹⁸⁹)R,SEELAVNDDLADSDAR,A(²⁰⁴)	88
					(²²⁹)R,SYPHLR,R(²³⁴)	23
					(²⁵¹)K,VLDLELK,G(²⁵⁷)	09
					(³¹⁸)K,LYGISLCQAILDETK,G(³³²)	32
					(³³⁸)K,ILVALCGRD(³⁴⁶)	55
Spot 41	28,3/8,2	ANXA1_BOVIN	63	6%	(⁵⁹)K,GVDEATIEILTK,R(⁷¹)	56
					(³⁰⁴)R,SEIDMNDIK,A(³¹²)	26
<hr/>						
<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Bos taurus)</i>						
Spot 41	28,3/8,2	VDAC2_BOVIN	102	12%	(³²)K,GFGFGLVK,L(³⁹)	11
					(¹⁷⁸)R,NNFAVGYR,T(¹⁸⁵)	33

					(²³⁶)K, YQLDPTASISAK, V(²⁴⁷)	58
					(²⁶⁸)K, LTLSALVDGK, S(²⁷⁷)	57
<hr/>						
<i>Citrate synthase, mitochondrial (Bos taurus)</i>						
Spot 42	34,7/7,6	CISY_BOVIN	93	4%	(²²³)R, EGSSIG AIDPK, L(²³³)	1
					(³⁴¹)R, VVPGYGHAVLR, K(³⁵¹)	93
<hr/>						
<i>Alpha-enolase (Bos taurus)</i>						
Spot 43	40,3/7,2	ENOA_BOVIN	192	11%	(⁸¹)K, KLVNVEQEK, I(⁸⁹)	56
					(⁹³)K, LMIEMDGTENK, S(¹⁰³)	37
					(¹⁶³)K, LAMQEFMILPVGAENFR, E(¹⁷⁹)	26
					(²⁴⁰)K, VVIGMDVAASEFYR, S(²⁵³)	73
<hr/>						
<i>Leucine-rich repeat-containing protein 37A2 (Bos taurus)</i>						
Spot 44	44,3/6,5	194676234	109	1%	(¹⁶³⁹)K, LILSENSLTELHK, D(¹⁶⁵¹)	62
					(¹⁷¹⁹)R, NPLTAVEDSYLFLK, L(¹⁷³¹)	49
<hr/>						
<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 2 (Bos taurus)</i>						
Spot 45	41,7/4,1	114053071	172	4%	(⁴⁹²)K, AYCFDGGCQDIDAR, C(⁵⁰⁵)	46
					(⁵⁶⁸)R, DSASVIYAFVR, S(⁵⁷⁸)	58

					(⁶¹⁵)R,CSEVGPYINR,V (⁶²⁴)	70
Spot 46	47,9/3,3	ADAM2_BOVIN	66	1%	(⁵⁴⁴)K,LILSENSLTELHK,D (⁵⁵¹)	66
<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (Bos taurus)</i>						
Spot 47	56,4/4,6	QCR1_BOVIN	149	6%	(²¹⁴)R,ADLTEYLSR,H (²²²)	35
					(²²⁹)R,MVLAAAGGLEHR,Q (²⁴⁰)	33
					(³⁷⁹)R,LCTSATESEVLR,G (³⁹⁰)	82
Spot 48	56,2/4,7	QCR1_BOVIN	151	6%	(²¹⁴)R,ADLTEYLSR,H (²²²)	36
					(²²⁹)R,MVLAAAGGLEHR,Q (²⁴⁰)	33
					(³⁷⁹)R,LCTSATESEVLR,G (³⁹⁰)	82
Spot 49	56,4/4,8	QCR1_BOVIN	119	6%	(²¹⁴)R,ADLTEYLSR,H (²²²)	31
					(²²⁹)R,MVLAAAGGLEHR,Q (²⁴⁰)	55
					(³⁷⁹)R,LCTSATESEVLR,G (³⁹⁰)	33
<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 (Equus caballus)</i>						
Spot 50	57,3/7,0	149704581	301	14%	(¹¹⁰)R,GIEMEVRL (¹¹⁶)	47
					(¹⁶⁷)K,ADGSTQVID,N (¹⁷⁷)	25
					(²⁸⁹)K,IDVSIEAASGGK,A (³⁰⁰)	83

					(³⁴⁷)K,IPNIYAIGDVVAGPMLAHK,A (³⁶⁵)	53
					(⁴⁰⁵)K,SEEQLKEEGIEYK,V (⁴¹⁷)	24
					(⁴⁰⁵)K,SEEQLKEEGIEYK,V (⁴¹⁷)	40
					(⁴⁹⁶)R,EANLAASFGK,S (⁵⁰⁵)	42
<i>Spot 51</i>	56,9/7,4	149704581	311	14%	(¹¹⁰)R,GIEMSEVR,L (¹¹⁷)	55
					(¹⁶⁷)K,ADGSTQVIDTK,N (¹⁷⁷)	28
					(²⁸⁹)K,IDVSIEAASGGK,A (³⁰⁰)	84
					(³⁴⁷)K,IPNIYAIGDVVAGPMLAHK,A (³⁶⁵)	51
					(⁴⁰⁵)K,SEEQLKEEGIEYK,V (⁴¹⁷)	29
					(⁴⁰⁵)K,SEEQLKEEGIEYK,V (⁴¹⁷)	45
					(⁴⁹⁶)R,EANLAASFGK,S (⁵⁰⁵)	48

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

Os estudos componentes deste trabalho alicerçam os conhecimentos básicos sobre o proteoma do plasma seminal de touros *Bos indicus*. Concatenadamente, os capítulos I, II, III e IV utilizam uma abordagem seqüencial dos temas partindo de um estudo descritivo sobre as proteínas do plasma seminal com relações robustas com a morfologia espermática (Capítulo II), seguido por associações entre as proteínas seminais e os métodos de coleta e criopreservação do sêmen de touros *Bos indicus*.

A descrição do proteoma do plasma seminal de touros *Bos indicus*, baseado em um número representativo de animais, alicerça os conhecimentos básicos sobre a fisiologia reprodutiva destes animais. O estudo contemplado no capítulo II confere um grande suporte de informações sobre o potencial reprodutivo dos touros *Bos indicus*, uma vez que as proteínas relacionadas com a morfologia espermática podem constituir marcadores moleculares da fertilidade nestes animais.

Os resultados mostrados nos Capítulos III e IV dão suporte ao desenvolvimento de novas tecnologias para serem empregadas na reprodução assistida de bovinos. A ideia é que o método de coleta do sêmen seja levando em consideração na formulação de novos diluentes e/ou aditivos para a criopreservação, uma vez que o método de coleta ocasiona mudanças do perfil proteico do plasma seminal e este demonstrou afetar os parâmetros seminais pós-criopreservação (Capítulo III e IV). Em outro aspecto, os resultados do Capítulo IV sugerem que as avaliações de sêmen pré-criopreservação empregadas atualmente não são suficientes para explicar todas as diferenças existentes nos parâmetros seminais pós-criopreservação. Por conseguinte, a associação entre fatores antioxidantes e os parâmetros seminais pós-criopreservação dão suporte ao desenvolvimento de novos testes capazes de identificar animais com maior criotolerância em análises de sêmen na pré-criopreservação.

A aplicação dos resultados obtidos com a presente pesquisa além de alicerçar futuros estudos sobre a fisiologia básica de touros *Bos indicus* criados em regiões tropicais, proporcionou avanços tecnológicos principalmente no desenvolvimento de testes capazes de prever de forma eficaz o potencial reprodutivo destes animais.