



Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência à congelação em ejaculados de diferentes varrões

Semen proteins and their relationship to freezing resistance in different boars

Ricardo Toniolli^{1,3}, Daianny Barboza Guimarães², Tatyane Bandeira Barros²

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen, FAVET/UECE, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Campus Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Correspondência: ricardo.toniolli@uece.br

Resumo

A identificação de proteínas presentes no sêmen possibilitará a busca por marcadores de congelabilidade. O presente trabalho teve como objetivo identificar proteínas espermáticas relacionadas com a proteção durante a criopreservação. O sêmen de quatorze reprodutores foi coletado uma vez por semana, descongelado, ressuspensão e analisado. Para o estudo da proteômica, estes foram submetidos à eletroforese bidimensional. A busca por marcadores de congelabilidade, foi feita pela divisão dos animais em dois grupos: congelabilidade boa (GFEs) e ruim (PFEs), através dos resultados de vigor e motilidade após a descongelação. Isto possibilitou comparar as proteínas presentes em cada grupo e correlacioná-las com a criopreservação do sêmen. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. A análise estatística foi processada através da avaliação das médias e desvios padrões, com os testes de Mann-Witney e o teste t de Student. Para comparação foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de Tukey (5%). Os animais de GFEs = $2,2 \pm 0,8$ e $41,8 \pm 22,9$ e os de PFEs = $1,9 \pm 0,6$ e $26,8 \pm 17,5$. Foram encontrados $263 \pm 62,2$ spots por gel e um total de $234,2 \pm 54,6$ spots de forma consistente nos géis dos animais. Foram encontrados 5 spots que divergiram entre os grupos (3 mais expressos no PFES e 2 spots no GFEs). No estudo da composição proteica da membrana espermática, os cinco spots detectados podem atuar como possíveis marcadores de congelabilidade para o sêmen suíno.

Palavras-chave: criopreservação, proteômica, sêmen suíno, espermatozoide.

Abstract

The identification of proteins present in the semen will enable the search for freezing markers. This study aimed identify the spermatic proteins that are related to the protection during cryopreservation. The semen from fourteen boars was collected once a week, thawed, resuspended and analyzed. For the study of proteomic, they were subjected to two-dimensional electrophoresis. To search for freezability markers, was made a division of the animals into two groups: good and bad freezability, through the results of vigour and motility after thawing. This made possible the comparison of the proteins present in each group and correlation between them and semen cryopreservation. The experimental lineation was in randomized blocks. The statistical analysis was made by evaluating the means and standard deviations, in which were applied the Mann-Whitney and Student t test. For comparison was used the ANOVA test with Tukey post-test was used (5%). The animals of GFEs = 2.2 ± 0.8 and 41.8 ± 22.9 and the PFEs = 1.9 ± 0.6 and 26.8 ± 17.5 . Were found 263 ± 62.2 spots per gel and a total of 234.2 ± 54.6 spots was consistently detected in the gels of the animals. The five spots that differed between groups were found (3 with greater intensity in PFES and 2 spots in GFEs). In the study of protein composition of the membrane sperm, the five spots detected can act as potential markers for boar semen freezability.

Keywords: cryopreservation, proteomics, swine semen, spermatozoa.

Introdução

A suinocultura tecnificada utiliza cada vez mais a inseminação artificial (IA) como componente do manejo reprodutivo, principalmente devido ao surgimento de linhagens genéticas de machos terminais que agregaram às carcaças qualidades exigidas pela tipificação da indústria de carnes. Após a IA, o sêmen é exposto a um ambiente diferente, com alteração significativa na função espermática, ocorrendo uma diminuição do número de espermatozoide no trato genital feminino nas primeiras horas (Bortolozzo et al., 2005). A qualidade espermática dos ejaculados é um dos principais fatores considerados para a seleção de reprodutores em uma criação (Toniolli, 1999).

Até o início da década de 70, a tecnologia da congelação do sêmen suíno era pouco desenvolvida e resultava sempre na perda da capacidade de fertilização dos espermatozoides (Bortolozzo et al., 2005), uma vez que vários fatores limitavam a utilização do sêmen congelado, sendo a baixa fertilidade o principal, porém não o único fator (Reed, 1985).

Reconhece-se a sensibilidade do espermatozoide à baixas temperaturas, manifestada já na faixa de +15 a +5°C (Wilmut e Polge, 1972). O processamento dispendioso, a utilização de muitas células por dose, momento crítico de inseminação, são pontos que dificultam a expansão e utilização do sêmen congelado em escala comercial (Reed, 1985).

Há também uma grande variabilidade na resposta dos ejaculados de machos suínos à congelação, a qual não é possível ser identificada pelos parâmetros convencionais de avaliação do sêmen *in natura* (Bortolozzo et al., 2005). Assim, apenas determinada proporção de cachos está habilitada a fornecer material fecundante capaz de resistir a esse processo (Treu, 1975), havendo poucos estudos que identifiquem as causas dessa variação individual.

Visando a otimização dos custos de produção, a técnica de criopreservação vem sendo aprimorada. Contudo, os resultados da aplicação desses métodos são ainda insuficientes, no tocante à preservação da fecundidade em níveis que atendam à demanda da produção comercial de leitões. Assim sendo, o uso do sêmen congelado ainda está restrito a eventuais importações para introdução de material genético e pesquisa (Scheid, 1991).

Consideráveis esforços da pesquisa devem ser aplicados na solução da problemática da conservação do sêmen suíno. A elevação dos resultados de fertilidade com o uso do sêmen congelado depende da geração de novos conhecimentos em um vasto campo da ciência, que inclui desde áreas como bioquímica e criobiologia, até aspectos aplicados às metodologias de congelação e a determinação do momento ideal de inseminação (Mariano et al., 1992).

A proteômica atualmente tem-se mostrado uma tecnologia importante, devido ao papel central das proteínas e interações proteína-proteína na função celular (Cox e Mann, 2007). Ela também melhora o entendimento dos eventos moleculares e como eles afetam a função biológica da célula espermática (Brewis e Gadelha, 2010). Contudo, ainda poucos estudos empregam abordagens proteômicas para analisar a infertilidade masculina.

Os trabalhos de proteômica tiveram por objetivo a associação de proteínas do sêmen suíno com a sua proteção ao processo de criopreservação, bem como a possibilidade de identificação de varrões com qualidade seminal compatível a uma boa criopreservação.

Constituintes do plasma seminal

Sua função é atuar como veículo para os espermatozoides ejaculados, diluindo e fornecendo substratos metabolizáveis para as células (Miller et al., 1990). Ele é essencial para as funções espermáticas *in vivo*, da ejaculação até a fertilização (Kraus et al., 2005). O plasma seminal é um fluido muito complexo (Rossato et al., 2002), constituído de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas e um número variado de proteínas. Ele é produzido pela rete testis, epidídimo e glândulas acessórias (Almeida, 2006) e fornece substratos que servem como fonte de energia para o metabolismo espermático (Mann e Lutwak-Mann, 1981). O plasma possui também substâncias enzimáticas e não-enzimáticas que servem como mecanismo de defesa antioxidante. Ele contém outros componentes antioxidantes, dentre eles a vitamina E, vitamina C, urato e a albumina (Almeida, 2006).

Os açúcares do plasma seminal, tais como a glicose e a frutose, atuam como principais fontes de ATP, mantendo a motilidade espermática (Mukai e Okuno, 2004Ve). Moléculas como o bicarbonato, são responsáveis por várias funções na célula espermática. A nível bioquímico, o bicarbonato aumenta o pH intracelular, estimula a atividade respiratória e facilita a abertura dos canais de cálcio, fundamentais para a capacitação espermática (Jaiswal e Conti, 2001).

As proteínas plasmáticas, são os constituintes orgânicos encontrados em maior quantidade e são importantes fisiologicamente para o sêmen, estando na forma de complexos associados, com composição, conformação e tamanho específico para cada espécie animal (Jelinková et al., 2003).

As principais características da superfície do espermatozoide são adquiridas durante sua maturação epididimária, mas também durante a ejaculação, pela adsorção de componentes específicos do plasma seminal (Amann et al., 1993). Estes elementos são principalmente glicoproteínas (Magargee et al., 1988). Vários estudos proteômicos têm sido conduzidos para determinar o conteúdo do plasma seminal, já que essas informações podem servir como ferramentas no diagnóstico de defeitos na espermatogênese (Alkimin, 2010).

Membrana plasmática do espermatozoide

O espermatozoide é uma célula alongada, formada por duas regiões altamente especializadas: a cabeça, na qual está contido o DNA, pequena quantidade de citoplasma e o acrossomo, que é uma vesícula contendo enzimas hidrolíticas, vital para sua penetração através da zona pelúcida; e o flagelo, envolvido com a motilidade da célula (Brewis e Gadelha, 2010). Neste segmento encontra-se a peça intermediária, contendo as mitocôndrias, relacionadas com a produção de energia (ATP) via fosforilação oxidativa (Manella, 2000).

A membrana espermática apresenta diferenças entre as espécies animais, com uma composição de



fosfolipídios e proteínas, além da temperatura de transição de fase que pode ser variável para cada tipo de fosfolipídio (Buhr et al., 1994). Tanto a cabeça, quanto a peça intermediária e a cauda do espermatozoide são cobertos por ela (De Jonge e Barratt, 2006).

Durante o processo de resfriamento, a separação lateral de fases pode ocorrer e as proteínas podem ficar agrupadas em locais onde há lipídios ainda em estado líquido, e assim a função das mesmas, importante para a integridade estrutural e/ou funcionamento da célula, pode ser afetada (Levis, 2000). Em função da separação de fases, há um aumento da permeabilidade da membrana com perda de cátions e enzimas, redução da atividade enzimática e perturbações nos processos de difusão (De Leeuw et al., 1990). Além disso, o desequilíbrio iônico intra e extracelular podem reduzir a motilidade espermática (Watson, 2000).

Na faixa de temperatura de 25 a 5°C, ocorre a redução da fluidez dos lipídios da membrana do espermatozoide suíno, o que poderia explicar sua maior sensibilidade ao resfriamento (Buhr et al., 1994). Um componente importante que participa da integridade da membrana é o colesterol, sendo a relação colesterol:fosfolipídios da membrana espermática do suíno mais baixa (0,12) do que a dos bovinos (0,38) e ovinos (0,36), podendo ser outro fator responsável pela sua maior sensibilidade a baixas temperaturas, pois afeta o estado de fluidez da membrana (Peltoniemi et al., 1999).

Os principais fatores que afetam a morfologia espermática são temperatura e umidade elevadas, ocasionando redução no número de células normais (Suriyasomboon et al., 2006). No teste de resistência osmótica (Gadea, 2005), há uma resposta celular à uma solução hiposmótica. Os espermatozoides íntegros, com membrana funcional, mantêm um equilíbrio osmótico com o ambiente em que se encontram. Ao sofrerem o choque osmótico, eles apresentam edema, dobrando ou enrolando a cauda, indicando que possuíam membranas funcionais antes do teste (Dell'Aqua Jr et al., 2002; Bernardi, 2008).

Desta forma, a integridade da membrana espermática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante (Parks e Graham, 1992). Pesquisas envolvendo a tecnologia da proteômica acabam por melhorar o entendimento dos eventos moleculares e como eles afetam a função biológica da célula espermática e, assim, permitem um maior conhecimento sobre os eventos que envolvem a fertilização (Gadella, 2008).

Conservação do Sêmen

Uma das principais expectativas de uso da IA em suínos depende do desenvolvimento de novas técnicas de armazenamento do sêmen (Cameron, 1998).

Refrigeração do sêmen

O sêmen suíno tem sido tradicionalmente armazenado em temperaturas entre 15 e 18°C após a diluição (Laforest e Allard, 1996). Essa temperatura, entretanto, é limitante para o armazenamento por períodos prolongados, em virtude de não reduzir muito o metabolismo dos espermatozoides e não impedir a multiplicação bacteriana, que influencia na qualidade do ejaculado, podendo limitar o período de armazenamento (Weitze, 1990).

Criopreservação do sêmen

A criobiologia por definição significa *cryo*= frio, *bios*= vida e *logos*= ciência, que é um ramo da biologia que estuda os efeitos das baixas temperaturas sobre as células, tecidos e organismos vivos. Seus primeiros registros de utilização datam de 2500 a.C (Almodin e Costa, 2011), entretanto, sua aplicação para a conservação de sêmen só foi iniciada por Polge et al. (1949). A congelação de ejaculados de cachorros representa apenas 1% do sêmen usado a nível mundial, apesar do mesmo estar disponível para uso sob esta forma desde a década de 1970 (Saraiva et al., 2005).

O espermatozoide suíno é bastante sensível à congelação. Seu emprego na inseminação artificial está associado à uma redução de 10 a 20% na taxa de parição e de 1 a 3 leitões por leitegada. Além disso, um menor número de doses é obtido por ejaculado submetido à congelação, o que aumenta os custos por dose produzida (Bortolozzo et al., 2005).

A redução da fertilidade ocorre devido a dois aspectos durante o protocolo de congelação, que são: morte celular e danos na capacidade funcional dos espermatozoides que sobrevivem (Watson, 2000). O estresse inicial se dá quando o espermatozoide está próximo a temperatura de 5°C (Squires et al., 1999) com a passagem do estado líquido cristalino para o estado de gel (Grajam, 1996; Medeiros et al., 2002). Pode-se evitar a formação intracelular de cristais de gelo com a remoção da maior parte de água de dentro das células (Visintim, 2002).

A criopreservação, supera o limite temporal no uso de um ejaculado, mas reduz a capacidade fertilizante da população espermática. Restrições ao uso do sêmen congelado apresentam-se também sob a forma de uma



variação individual de ejaculados de reprodutores que suportam ou não a criopreservação (Johnson, 1985; Reed, 1985). Nem todos os animais apresentam resultados ruins para a criopreservação, o que permite classificá-los como sêmen bom ou ruim para a congelação (Casas et al., 2009).

Observou-se que machos de uma mesma espécie, apresentavam diferenças em relação aos resultados de fertilidade, com o uso de sêmen resfriado e com sêmen congelado. Este problema foi particularmente observado na espécie suína, onde o cachaço com fertilidade normal em monta natural ou inseminação artificial com sêmen resfriado, apresentou espermatozoides inviáveis após o processo de criopreservação (Larsson et al., 1976).

Os resultados insatisfatórios estão relacionados com o fato do espermatozoide suíno ser bastante sensível a baixa temperatura, mas a resistência das células espermáticas parecem ser mais dependentes das características individuais do que ao processo de criopreservação em si (Medrano et al., 2009). Nem todos os animais apresentam resultados ruins para a criopreservação, o que permite classificá-los como sêmen bom ou ruim para a congelação (Casas et al., 2009).

Uma particularidade da criopreservação é que cada animal tende a apresentar resultados semelhantes após a congelação seminal quando comparado com seus resultados anteriores, ou seja, o animal que apresentou uma boa congelabilidade, tende a apresentar sempre bons resultados (Rath et al., 2009), levando então a considerar sua origem genética como um fator dependente para a proteção espermática após a criopreservação (Thurston et al., 2002; Roca et al., 2006).

Essas características particulares que faz com que cada animal apresente o mesmo resultado para a criopreservação, ainda não foram determinadas. Estudos vem sendo realizados com o intuito de aumentar o conhecimento a respeito da base molecular do sêmen, identificando as proteínas e a intensidade com que estas estão expressas nos animais (Moura et al., 2006) e correlacioná-las com a proteção espermática após a criopreservação.

O aumento do uso de programas de inseminação artificial em granjas comerciais de suínos, exige cada vez mais o desenvolvimento de técnicas que possibilitem um aumento na produção dessas granjas. Necessário se faz o aperfeiçoamento de biotécnicas, que possam ser utilizadas como ferramentas para a otimização da utilização da inseminação artificial (Corrêa et al., 2001).

A conservação de sêmen suíno e sua utilização na inseminação artificial, se faz através de seu resfriamento, sendo limitada a viabilidade do sêmen. Para se aumentar o período desta viabilidade, necessita-se do uso do sêmen congelado (Hess, 1960).

Apesar dos dados atuais de produtividade com sêmen congelado serem desanimadores em termos de perspectivas do uso da técnica em grande escala, alguns pesquisadores apontam para um futuro promissor, com os avanços das novas tecnologias e equipamentos de congelação de sêmen (Wolders e Ten Napel, 2005).

Entre as vantagens da criopreservação, destacam-se também a otimização do uso de machos com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen por tempo ilimitado e a quebra das barreiras geográficas (Barreto et al., 2008). No entanto, alguns animais apresentam resultados ruins quanto à congelação de sêmen e as características particulares que levam alguns ejaculados a resistirem ao processo de criopreservação melhor do que outros, permanece sem ser identificada (Casas et al., 2010).

Como fonte inovadora para a viabilização do uso de sêmen congelado, estudos tem sido realizados a fim de identificar substâncias presentes no ejaculado que possibilitem a busca por marcadores de congelabilidade através da caracterização de proteínas específicas envolvidas na atividade espermática (Collares et al., 2005) e que estariam associadas à ejaculados viáveis após a descongelação.

Todos os fatores que tornem esta fonte proteica mais acessível merecem ser estudados. Para isto, a busca por novas alternativas em pesquisas, é imprescindível, objetivando maximizar o uso de novas biotécnicas e proporcionar maiores taxas de sucesso (Nagai, 1996).

Proteômica

A proteômica é um estudo dos produtos proteicos expressos pelo genoma e serve para identificar mecanismos celulares envolvidos em processos biológicos. Além disso, ela permite o conhecimento de suas estruturas proteicas, localização, modificação, interação, atividade e funções (Carbonaro, 2004). Ela constitui-se em uma importante tecnologia, disponível aos pesquisadores da era pós genômica, já que esta molécula está presente em todas as células, constituindo ponto fundamental sob o aspecto estrutural e funcional nos organismos vivos. Cada proteína é especializada para uma determinada função, conhecê-la significa entender melhor determinado processo biológico presente em um indivíduo (Cox e Mann, 2007).

No estudo das proteínas, a sua compreensão, identificação, quantificação e caracterização, permitem identificar as funções de diversos tipos celulares, incluindo o espermatozoide. O estudo proteico do espermatozoide é bem mais simples, quando comparado ao das células somáticas. Isso ocorre em virtude da célula espermática ser altamente especializada com uma quantidade mínima de citosol e organelas (Boerke et al., 2007).

A análise proteômica em espermatozoides é de grande importância, pois ela permite uma avaliação da



infertilidade, auxiliando em diagnósticos do estado fisiológico dos órgãos reprodutivos. Ela também permite um maior entendimento sobre as interações das proteínas do plasma seminal com o espermatozoide, bem como a interação das células e seus ligantes que ocorrem na superfície espermática (Strzezek et al., 2005). Em virtude dessas características, as informações a seguir tiveram como objetivo realizar um relato sobre a técnica de proteômica e a sua importância na avaliação da fertilidade de machos domésticos.

Estudo das proteínas

Esta ferramenta tem-se apresentado de grande importância na biotecnologia da reprodução animal, uma vez que em diversas espécies com alto valor econômico, técnicas avançadas de proteômica têm sido empregadas para a detecção de marcadores bioquímicos da fertilidade e da congelabilidade do sêmen (Strzezek et al., 2005).

As diferenças de fertilidade observadas entre animais, muitas vezes, não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen. (Den Daas et al., 1992; Amann, 1993). Análises bioquímicas, associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam auxiliar na identificação de diferenças importantes entre a fertilidade potencial dos animais. Neste sentido, estudos desenvolvidos mostram que há evidência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliadas *in vivo* e *in vitro*. Tais proteínas podem ser consideradas como potenciais marcadores moleculares da fertilidade (Moura et al., 2006).

As proteínas podem tanto ser provenientes da membrana plasmática quanto do plasma seminal. As da membrana espermática podem funcionar como moléculas receptoras ou de adesão com funções importantes nos eventos de reconhecimento e sinalização da fertilização (Chen et al., 2002). Já as do plasma seminal podem afetar a função seminal, indo desde a motilidade espermática (Elzanaty et al., 2007), até eventos chave relacionados à função espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário (Chen et al., 2002).

Proteínas espermáticas

A célula espermática não possui capacidade de produção proteica, sendo que sua composição de superfície não pode ser alterada pela inserção de novas proteínas sintetizadas. Desta forma, futuras mudanças em sua composição requerem mecanismos alternativos para que isto seja possível. Estas alterações incluem mudanças de localização, expressão proteica, estrutura molecular e mobilidade lateral dos componentes da bicamada (Myles et al., 1990). Segundo Metz et al. (1990) tais alterações podem agir permitindo um aumento da resistência celular a danos citoplasmáticos por choque térmico.

Dentro do útero, ocorre uma série de mudanças na superfície espermática, como a reorientação e modificação nas moléculas, que ocorrem quando o espermatozoide é ativado por fatores capacitantes e pela hiperativação. Estas mudanças na superfície permitem a ligação entre a célula espermática e a matriz extracelular do oócito (zona pelúcida), através de proteínas membranares que reconhecem e permitem esta ligação, e que também induzem a reação acrossomal. Um outro conjunto de proteínas membranares (região equatorial do espermatozoide) está envolvido na adesão e fusão dos gametas durante a fertilização (Gadella, 2008).

Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal é um fluido orgânico que tem como função transportar os espermatozoides até o local onde acontecerá a fertilização. Ele é constituído de secreções provenientes das glândulas acessórias, que são misturadas aos espermatozoides durante a ejaculação (Moura et al., 2006). Além disso, seus constituintes podem atuar modulando a função espermática (Moura et al., 2007).

Em um estudo proteômico do fluido da glândula sexual acessória de touros Holstein, foram identificadas proteínas como albumina, nucleobindinas, osteopontina, espermedesina e BSP (Bull seminal plasma proteins). Elas foram encontradas com diferentes graus de variação, que sugerem a existência de um mecanismo complexo, pelo qual a síntese de proteínas do AGF é controlada e que elas modulam funções espermáticas importantes após a ejaculação. O plasma seminal de touros de alta fertilidade apresentavam grande quantidade de BSP A1/A2 e A3, BSP 30 kDa, clusterina, albumina, PLA, e osteopontina e sua mistura aos espermatozoides de touro de baixa fertilidade aumentaram a capacidade de penetração nos oócitos (Moura et al., 2007).

Em suínos, Bianchi et al. (2008) identificaram um polipeptídeo de 26,58 kDa presente no plasma seminal. Segundo esses autores esta substância está associada à baixa integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, quando estes são submetidos à congelação/descongelação, o que explicaria a maior sensibilidade espermática desta espécie para os danos causados pelo frio.

Em cachorros, mais de 90 % das proteínas do plasma seminal são representadas pela família das espermedesinas, um grupo de glicoproteína de 12-16 kDa, que se ligam à superfície espermática. Elas possuem de 110 a 113 aminoácidos na sua estrutura e compreendem um único domínio proteico estabilizado por pontes dissulfídicas (Caballero et al., 2008).



A espécie suína é a que apresenta maior diversidade de membros dessa família, com as seguintes espermadinas identificadas no plasma seminal: as AWN, AQN-1, AQN-3 (Calvete et al., 1996) e PSP-I/PSP-II (Varela et al., 1997). Estas duas últimas representam mais de 50 % do total de proteínas presente no plasma seminal. Em função de sua capacidade de união à heparina, as elas são classificadas em proteínas que se unem (AQN-1, AQN-3, AWN) e proteínas que não se unem (heterodímero PSP-I/PSP-II) à heparina (Calvete et al., 1996).

Essas proteínas influenciam a motilidade espermática (Centrion et al., 2003) ligando-se à superfície do espermatozoide ejaculado (Töpfer-Petersen et al., 2000) e atuam também na capacidade de penetração no oócito (Caballero et al., 2004), o que sugere a existência de um complexo mecanismo destas proteínas no macho.

Estudos demonstraram que após a ejaculação, um espermatozoide apresenta aproximadamente entre 10 e 60 milhões de moléculas de espermadinas recobrando sua superfície. Entretanto, a maioria destas moléculas é eliminada após o processo de capacitação *in vitro* (Dacheux et al., 2005). Esta cobertura proteica teria a função de prevenir reação acrossômica prematura, sendo a mesma liberada após a capacitação (Jansen et al., 2001).

Proteômica do sêmen

O estudo do proteoma permite obter informação sobre os perfis de expressão das proteínas referentes à sua abundância e localização (Yamakawa et al., 2007). Ela é uma das principais alternativas para compreender as interações do plasma seminal com a superfície dos espermatozoides (Strzezek et al., 2005).

A identificação dos grupos proteicos presentes no ejaculado pode dar suporte a diversas linhas de pesquisas, tais como: criopreservação de gametas, busca de marcadores de congelabilidade e melhoramento de técnicas de fertilização *in vitro*, através da caracterização de proteínas específicas envolvidas na atividade espermática (Collares, 2005). Desta forma, a caracterização de proteínas presentes no sêmen, com a identificação de alguns desses polipeptídeos, vêm sendo utilizada como marcador seletivo de fertilidade e de congelabilidade do sêmen (Jobim et al., 2004; Moura et al., 2006).

Uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo do proteoma, proposta por O'Farrel (1975) é a eletroforese bidimensional, que consiste em separar, sob a influência de um campo elétrico, as moléculas através de suas cargas. Para isto, são realizadas duas corridas eletroforéticas sequenciais. Ocorre a focalização isoelétrica (IEF), que separa as proteínas próximas ao seu ponto isoelétrico (Voet e Voet, 2006).

Logo após a focalização isoelétrica, ocorre a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE que separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares, agindo como uma peneira molecular, em que as moléculas de menor peso migram mais facilmente na vertical do gel e as moléculas de maior peso molecular ficam retidas na sua porção superior (Rocha et al., 2009).

A eletroforese 2D resulta da combinação de duas técnicas: a focalização isoelétrica, seguida por uma separação de SDS-PAGE. Quando bem sucedida obtêm-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos spots, bem separados, cada um correspondendo a uma proteína (Santos et al., 2004).

Proteômica e a criopreservação seminal

A criopreservação é uma importante biotécnica dentro da reprodução animal, por superar o limite do uso temporal do sêmen. Apesar de seu potencial, ela reduz a capacidade fertilizante de uma determinada população espermática, tendo sido observado uma variação individual em suínos que tiveram o sêmen congelado (Mies Filho et al., 1978).

Já foi observado que células e organismos multicelulares respondem a situações estressantes, induzindo ou aumentando a síntese de grupos de proteínas. No caso de estresse como o choque térmico, essas proteínas foram identificadas como HSPs (Heat shock proteins) (Lindquist, 1986). Essa classe de proteínas provê a resistência contra o estresse oxidativo (Fukuda et al., 1996), a apoptose (Powers et al., 2008) e media proteção celular durante estresse térmico (Casas et al., 2010).

O potencial da proteína HSP90AA, foi testado por sua capacidade de prever a habilidade de congelção do sêmen suíno. Foi observada uma queda na concentração desta proteína ao longo da criopreservação. Sua concentração foi maior em ejaculados de boa congelção, ou seja, aqueles que com motilidade superior a 40% no pós resfriamento (17°C) e durante adição de glicerol (5°C). Essa proteína pode interferir em ações futuras do ejaculado frente ao choque térmico e sua diminuição seria em consequência dos danos estruturais que a célula espermática sofre durante a congelção (Casas et al., 2010).

Na avaliação do perfil eletroforético das proteínas presentes na membrana espermática de touros, após coleta, diluição, congelção e criopreservação seminal, foi observado que ocorreu uma diminuição da heterogenicidade proteica, assim como a adição de algumas proteínas de membrana, o que levou uma expressiva alteração na composição proteica da membrana espermática frente aos processos acima citados. Essas alterações podem levar a variações dos padrões de fertilidade dos animais (Roncoletta et al., 1999).

A identificação de proteínas da membrana espermática, envolvidas no processo de fertilização, pode

servir como marcadores bioquímicos e auxiliar no desenvolvimento de testes que avaliem a fertilidade de machos doadores de sêmen. Esta identificação também pode ajudar na formulação de melhores protocolos para a criopreservação de sêmen (Ollero et al., 1998).

A: Proteínas espermáticas x Criopreservação do sêmen suíno

Os animais foram separados em grupos de PFEs (Má congelabilidade) e GFEs (Boa congelabilidade), através dos resultados de vigor e motilidade espermática analisados logo após a descongelção seminal. O ponto de corte para considerar o animal no grupo GFEs era vigor $\geq 2,0$ e motilidade $\geq 40\%$. Dos quatorze animais utilizados no presente estudo, seis foram considerados GFEs (vigor espermático de $2,2 \pm 0,8$ e motilidade espermática $41,8 \pm 22$), e oito foram considerados PFEs (vigor espermático de $1,9 \pm 0,6$ e motilidade espermática $26,8 \pm 17,5$).

Resultado 1

Os resultados dos parâmetros avaliados após a descongelção quanto a viabilidade do sêmen congelado neste estudo confirmam que, mesmo sob as mesmas condições de criopreservação, o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não foi o mesmo para ejaculados proveniente de animais diferentes.

Resultado 2

Quanto à análise das proteínas de membrana do espermatozoide suíno, foi detectado em média, $263 \pm 62,2$ spots por gel, o qual representa uma combinação de todos os spots presentes no gel de referência (Fig. 1). Um total de $234,2 \pm 54,6$ spots foi detectado de forma consistente nos géis dos quatorze animais. Já no grupo GFEs apresentou $211,8 \pm 64,4$ spots em comum entre os seis animais do grupo, enquanto que no PFEs apresentou $251 \pm 42,8$ spots em comum entre os oito animais. Quanto aos totais de spots analisados, foi detectado diferença significativa ($P < 0,05$) na intensidade de cinco deles (Fig. 1).

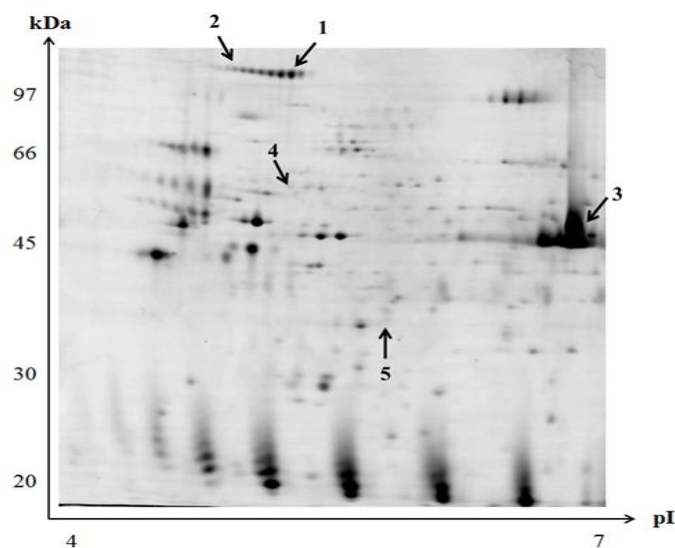


Figura 1. Gel Bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides suínos.

Resultado 3

Os spots 1, 2 e 3 foram encontrados em uma intensidade maior nos animais do grupo PFEs (Figura 2A e 2B), e os spots 4 e 5 foram encontrados com uma maior intensidade nos animais do grupo GFEs (Figura 2C e 2D). O spot 1, com 117,2 kDa e 5,3 pI, foi detectado nos oito animais do PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi detectado nos seis animais (Fig. 2A). O spot 2, com 121,4 kDa e 5,0 pI, foi detectado em sete animais do grupo PFEs e em cinco animais do GFEs (Fig. 2A). Já o spot 3, com 49,8 kDa e 6,7 pI, foi encontrado em seis animais de cada grupo (Fig. 2B).

A intensidade óptica integrada de cinco pontos foi diferente ($P < 0,05$) entre os grupos (Fig. 2) e suas identidades são apresentadas na tabela 1. As intensidades de manchas de proteína identificadas como fragmento Fc de **proteína de ligação a IgG** (manchas 1 e 2 – Fig. 1) e **precursor de lactaderina** (mancha 3 – Fig. 1) foram mais intensas nos mapas 2D de proteínas de membrana de esperma de animais PFE (Figura 2A e 2B, respectivamente). As intensidades do precursor da **arilsulfatase A** (mancha 4 – Fig. 1) e da **subunidade alfa**

1 da proteína de bloqueio da actina F (mancha 5 – Fig. 1) foram mais intensas nos mapas dos varrões do GFE (Figura 3C e D, respectivamente).

Resultado 4

O **spot 4**, com 61,4 kDa e 5,3 pI, foi detectado nos oito animais do PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi detectado em quatro animais (Fig. 2C). E o **spot 5**, com 36,8 kDa e 5,8 pI, foi detectado em seis animais do grupo PFEs, enquanto que no grupo GFEs, foi encontrado em cinco animais (Fig. 2D).

As diferenças quanto à intensidade da expressão de determinadas proteínas podem variar para cada animal, mesmo que estes sejam da mesma espécie. Estas diferentes expressões podem influenciar diretamente na proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen, visto que em estudos anteriores mostraram diferença na intensidade de proteínas e correlacionaram com os resultados da criopreservação do sêmen suíno. Foi observado que a proteína Acrosina (ACRBP) foi encontrada com maior intensidade em GFEs e a Triose Fosfato Isomerase (TPI) foi mais expressas em PFEs, podendo então estas duas proteínas atuarem como marcadores de congelabilidade para sêmen suíno.

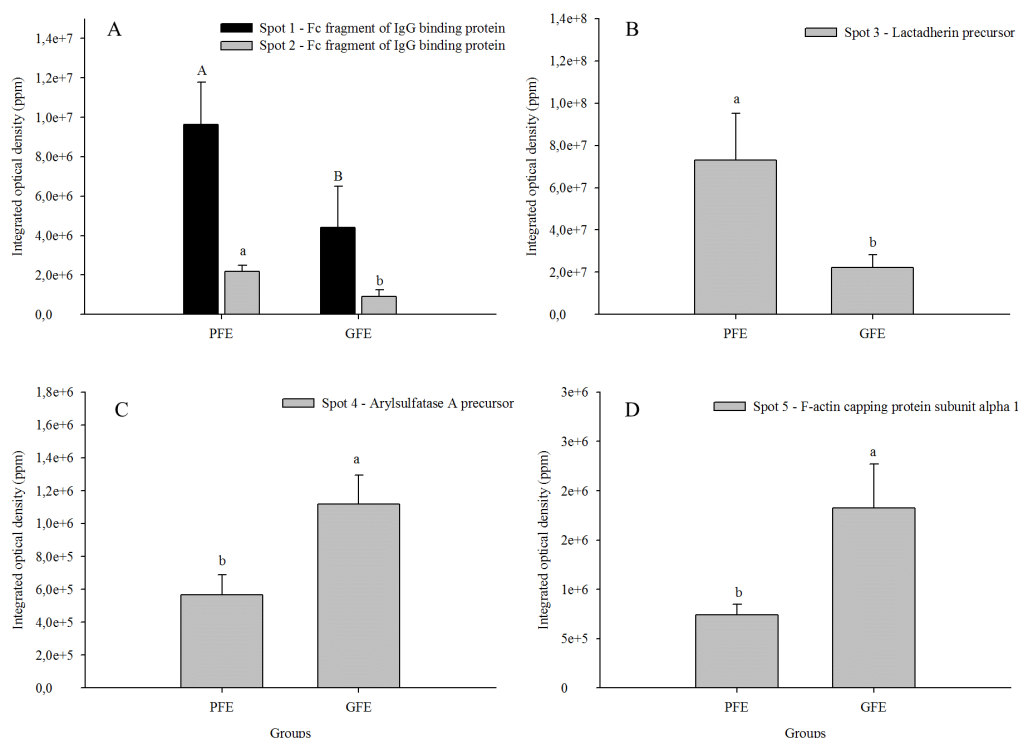


Figure 2. Intensidades dos spots significativamente mais expressos nos mapas bidimensionais de proteína enriquecida com proteínas de membrana de esperma de varrões nos grupos PFEs (A e B) e GFEs (C e D).

A) Pontos 1 e 2 identificados como fragmento Fc da proteína de ligação a IgG;

B) Ponto 3 identificado como precursor de Lactadherina;

C) Ponto 4 identificado como precursor de Arilsulfatase A;

D) Ponto 5 identificado como subunidade alfa da proteína de bloqueio da actina F 1.

B: Proteínas plasmáticas x Marcadores de congelabilidade

Os animais foram separados em grupos de PFEs (Má congelabilidade) e GFEs (Boa congelabilidade), através dos resultados de vigor e motilidade espermática analisados logo após a descongelção seminal. O ponto de corte para considerar o animal no grupo GFEs era vigor $\geq 2,0$ e motilidade $\geq 40\%$. Dos quatorze animais utilizados no presente estudo, seis foram considerados GFEs (vigor espermático de $2,2 \pm 0,8$ e motilidade espermática $41,8 \pm 22$), e oito foram considerados PFEs vigor espermático de $1,9 \pm 0,6$ e motilidade espermática $26,8 \pm 17,5$).

O ejaculado de todos os animais apresentavam características semelhantes e pelas análises de vigor e motilidade, também estavam em ótimo estado para a criopreservação. Contudo, após a descongelção, foi possível observar que alguns ejaculados foram mais sensíveis aos danos da criopreservação do que outros, sendo separados em dois grupos (PFEs e GFEs). Os resultados após a descongelção quanto à viabilidade do sêmen confirmaram que, mesmo sob as mesmas condições de criopreservação, o grau de alterações produzidas não foi

o mesmo para ejaculados provenientes de diferentes varrões.

Resultado 1

Foram as proteínas encontradas no estudo. Em média, foram detectados 468 spots por gel (Fig. 1a), o qual representa uma combinação da todos os spots presentes no gel de referência (Fig. 1b), além dos spots adicionados dos outros géis. Um total de 28 *spots* diferenciais foi detectado de forma consistente em todos os géis pareados pelo aplicativo PDQuest. Estes spots foram submetidos à espectrometria de massas, dos quais vinte e oito foram identificados e corresponderam a dezesseis proteínas.

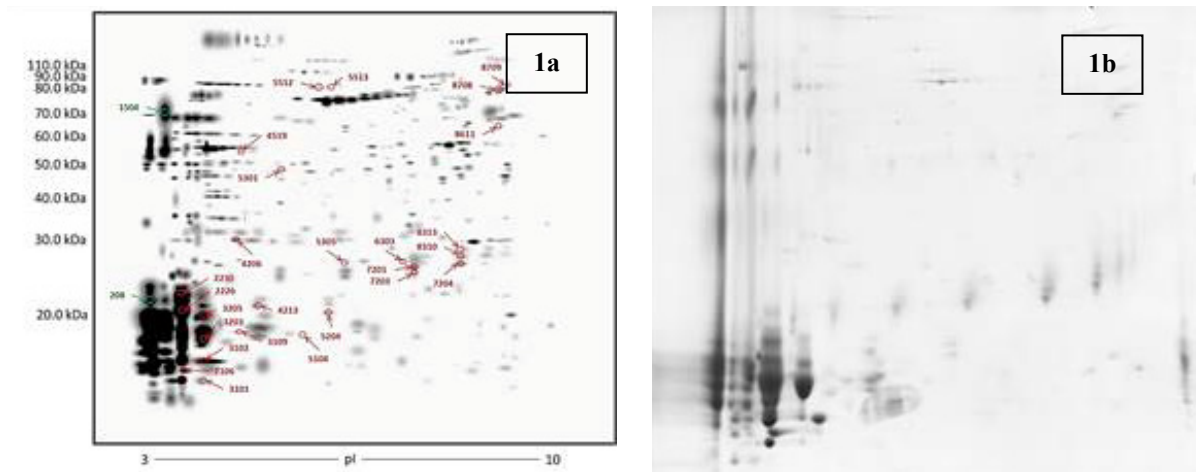


Figura 1. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de suínos.

Figura 1a: gel sintético, baseado na combinação dos spots de todos os membros do estudo.

Figura 1b: mapa referência (Animal #3246), do qual o gel sintético foi primeiramente gerado.

Resultado 2

Proteínas do **Grupo GFEs**. Quanto aos totais de spots analisados, foi observado que dois spots (208 e 1504) foram expressos com maior intensidade nesse grupo (Figura 2). Nos dois spots encontrados em maior abundância no grupo GFEs, foram identificadas a Carbohydrate-binding protein (AWN) no spot 208 e as Bone morphogenetic protein e Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, presentes no spot 1504. A NADH-ubiquinone oxidoreductase foi encontrada em ambos os spots.

Dentre as quatro proteínas diferenciais identificadas nesse grupo, a Carbohydrate-binding protein foi a única característica do plasma seminal, as demais são proteínas celulares, associadas ao metabolismo celular e geração de energia. Possivelmente a presença de proteínas celulares deva-se a questões metodológicas do estudo, pois a centrifugação realizada para separar o plasma seminal das células espermática, através da força centrífuga gerada pode levar a saída de substâncias do interior do espermatozoide e contaminar o plasma seminal ou até mesmo proteínas da própria membrana pelo efeito físico direto.

A Carbohydrate-binding protein (AWN) é da família das espermedesinas, encontrada no plasma seminal do suíno e que se liga a superfície do espermatozoide ejaculado (Haase et al., 2005). Membros dessa família apresentam função de inibição de uma capacitação espermática prematura, uma vez que esta pode ser iniciada por ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Rivlin et al., 2004), os quais podem ser produzidos em excesso pela técnica de criopreservação. Essa proteína também promove uma economia de energia pela célula espermática através da diminuição da sua atividade metabólica e motilidade. Ela previne a síntese de EROs, e também contribui na sua eliminação por possuir atividade antioxidante (Schoneck et al., 1996). A este respeito, pode-se supor que a maior quantidade dessa proteína no plasma seminal de suínos com alta congelabilidade, proporciona uma melhor proteção à membrana espermática durante procedimentos de congelção.

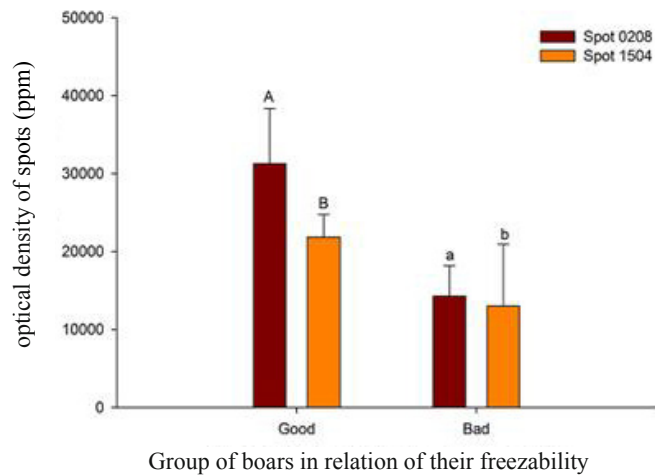


Figura 2. Intensidades dos spots 208 e 1504 no mapa bidimensional do plasma seminal de suínos, agrupados de acordo com os grupos PFEs e GFEs.

Resultado 3

Proteínas do **Grupo PFEs**. Vinte e seis spots foram encontrados com maior intensidade nesse grupo. Estes foram subdivididos quanto a sua abundância em três categorias: alta, média e baixa abundância (Fig. 3). Dos 26 spots analisados, foram identificadas 10 proteínas presentes em maior abundância no grupo PFEs. Como também ocorrido no grupo GFEs foram identificadas 10 proteínas características do plasma seminal e proteínas celulares, subdivididas em dois subgrupos: a) as proteínas do plasma e b) as proteínas espermáticas.

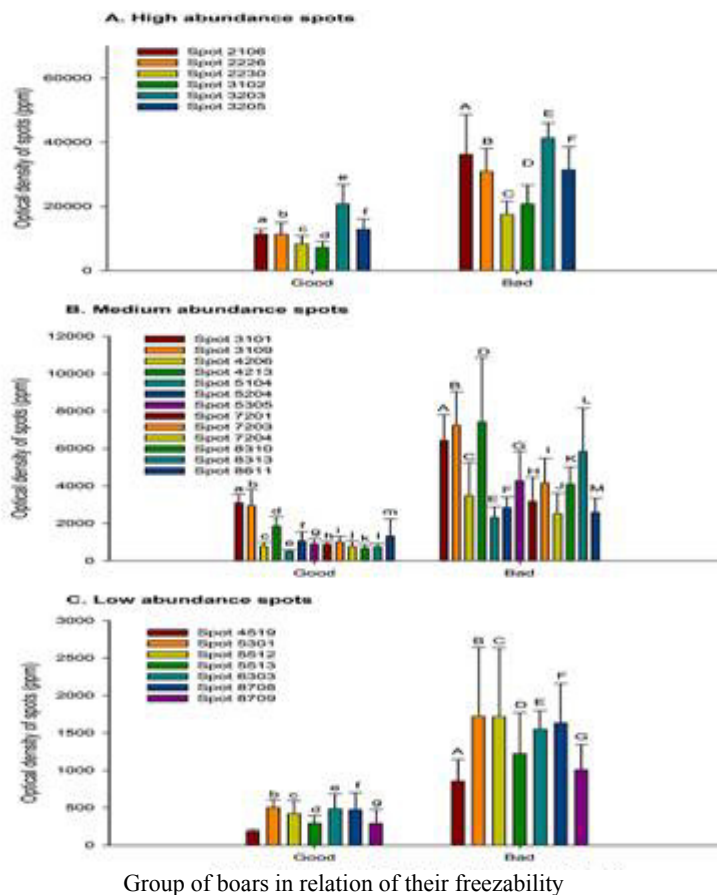


Figura 3. Intensidades dos spots mais expressos no grupo PFEs, no mapa bidimensional do plasma seminal de suínos. Figuras 4a, 4b e 4c: Spots diferenciais com baixa abundância nas PFEs



a) Proteínas do plasma: Carbohydrate-binding protein (AQN1) foi a proteína encontrada no spot 3102, em alta abundância no plasma seminal suíno, bem como a Beta-microseminoprotein (MSMB). A proteína Inibidora da carbonic anidrase foi identificada nos spots 5512 e 5513, ambos em baixa abundância. A proteína presente no spot 6303 foi identificada como Epididymal secretory glutathione peroxidase, de forma significativa nas PFEs, mas em baixa abundância (Figura 3).

A proteína **Carbohydrate-binding protein** (AQN1) pertence à família das espermedesinas, grupo de proteínas mais estudadas do plasma seminal suíno. Análises da sequência de aminoácidos das espermedesinas mostraram que elas pertencem a uma grande família de proteínas reguladoras do desenvolvimento, possuindo uma atividade ligante a zona pelúcida estando implicada nos eventos de reconhecimento e ligação espermatozoide-oócito (SANZ et al., 1992), com sua função atrelada a eventos que ocorrem no interior do aparelho reprodutor feminino.

A proteína **Beta-microseminoprotein** (MSMB) é uma proteína não glicosilada relativamente pequena com uma massa molecular de 10 kDa sendo conhecida como proteína secretora prostática (PRPS, PSP ou PSP94), sendo um componente abundante no plasma seminal. Ela também pode ser detectada, em níveis baixos, em outros tecidos humanos com capacidade secretora.

A proteína **Inibidora da carbonic anidrase** (CA) pertence a um grupo de metaloenzimas contendo zinco que catalisam a interconversão do dióxido de carbono a bicarbonato ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Ela está presente em quase todos os órgãos, apresentando várias funções biológicas, sendo a mais importante delas é a participação na regulação de íons, água e balanço ácido-base. Estudos demonstraram que testículo, ductos eferentes, epidídimo, ductos deferentes, vesícula seminal e próstata em algumas espécies (Ekstedt e Ridderstale, 1992), contém atividade CA. Nos testículos ela pode ser localizada nas células de sertoli e Leyding e no tecido intersticial de suínos (Ekstedt et al. 1991). Harris e Goto (1984) demonstraram que proteínas inibidoras da atividade CA em testículos de frango e dutos deferentes resultaram em uma redução no volume espermático e plasma seminal por coleta. Logo a atividade da proteína inibidora da CA pode ser utilizada como um marcador negativo da fertilidade em suínos.

A proteína **Epididymal secretory glutathione peroxidase**, apesar de ter sido encontrada de forma significativa no grupo de PFEs, sua abundância foi baixa quando comparada as demais. Esta proteína secretada pelo epidídimo também foi encontrada por Novak et al. (2010) e sua função está relacionada a proteção da integridade e a função do espermatozoide contra o ataque das espécies reativas de oxigênio, que são gerados durante o processo de maturação. Moura et al. (2010) também encontraram a glutathione peroxidase nos fluidos da cauda do epidídimo de touros da raça Holandesa. Talvez, essa proteína precise de uma concentração maior para exercer sua atividade antioxidante em suínos.

Conclusões

Sob as mesmas condições de criopreservação, cada animal apresenta um resultado para a congelação do sêmen, pois o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não é o mesmo para ejaculados provenientes de diferentes animais. Essas diferenças podem estar relacionadas com a intensidade da expressão de determinadas proteínas, que variam para cada indivíduo, mesmo entre animais da mesma espécie. Estas diferentes expressões podem influenciar diretamente na proteção espermática ao processo de criopreservação do sêmen.

Trabalho A

A capacidade das células espermáticas resistirem ao processo de criopreservação seminal é diferente para cada animal, mesmo sendo da mesma espécie. Desta forma, o uso de marcadores de congelabilidade representa uma vantagem para a criopreservação do sêmen, porque evita utilizar ejaculados que não conseguem resistir ao estresse causado pela criopreservação. Foram encontradas cinco proteínas, onde duas delas podem ser utilizadas como marcadores de boa congelabilidade, visto que estão presentes em ejaculados que apresentam viabilidade espermática após a criopreservação do sêmen.

Trabalho B

Diante do exposto sobre as proteínas diferenciais encontradas entre os grupos testados, pode-se concluir que a Carbohydrate-binding protein pode ser utilizada como um marcador de congelabilidade para a espécie suína, estando presente em ejaculados que suportam bem o processo de criopreservação espermática.

Perspectivas

A busca por melhores resultados na criopreservação do sêmen é necessária, pois alguns pesquisadores apontam esta técnica para um futuro promissor, devido aos avanços das novas tecnologias e equipamentos de



congelação de sêmen. Alguns, afirmam até que o uso do sêmen criopreservado substituirá o uso do sêmen refrigerado, onde o sêmen congelado de suínos será comercializado nos grandes Centros de Inseminação Artificial e intensamente utilizado em granjas comerciais.

Através de maiores estudos, a criopreservação poderá ter uma maior aceitação e ser executada com maior frequência. Já os cachacos devem ser testados individualmente, utilizando marcadores moleculares de congelabilidade espermática, para prever as possibilidades de cada animal para a criopreservação, antes de serem utilizados na produção evitando-se gastos desnecessários.

Considerações Finais

Apesar de já ser conhecida uma grande quantidade de proteínas que atuam sobre a célula espermática, muitas questões ainda precisam ser elucidadas, quanto às suas funções fisiológicas, forma e momento de atuação, com a finalidade de se conhecer os fenômenos que cercam processos fisiológicos, tais como a fertilização.

Além disso, em virtude do seu potencial ligado à reprodução animal, a proteômica pode auxiliar na identificação de marcadores de fertilidade ou de ejaculados aptos ao processo de congelação/descongelação em machos de diversas espécies, e dessa forma tornar mais viável essa técnica para espécies com extrema sensibilidade ao choque térmico, como os espermatozoides suínos e, principalmente, evitar gastos, sejam eles de manutenção de reprodutores com sêmen de baixa qualidade para a congelação, ou com a técnica em si, ao se congelar e descongelar um sêmen que não trará bons resultados de fertilidade.

A congelabilidade do sêmen é uma característica importante que pode levar ao melhoramento genético animal através da realização de técnicas como a inseminação artificial e a fertilização *in vitro*. Ela é particularmente importante para a espécie suína, na qual ainda não existe um protocolo de criopreservação seminal bem estabelecido. Contudo, diversos estudos têm demonstrado que o processo de criopreservação acarreta estresse oxidativo à célula espermática, podendo ocasionar danos irreparáveis à célula com perda de função.

Além disso, as diferenças observadas nos resultados de fertilidade entre diversos animais, muitas vezes não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do ejaculado. Esses métodos de avaliação tem sido objeto de importantes progressos nos últimos anos, como a introdução da proteômica para busca de marcadores de fertilidade e/ou congelabilidade.

Desta forma, a identificação de marcadores de congelabilidade, permitirá se colocar previamente em evidência o potencial genético de um animal, contribuindo significativamente com a escolha específica de reprodutores superiores que poderão apresentar ao final de processos como a criopreservação, bons resultados de fertilidade.

Referências

- Alkmin DV.** Efeito da fração do ejaculado e do método de conservação sobre as características físicas do sêmen suíno e a fertilidade de fêmeas. 2010, 228p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 2010.
- Almeida JL.** Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 2006. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Brasília: FAMV, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006.
- Almondin CG, Costa RR.** Criopreservação de gametas, embriões e tecido germinativo em laboratório de fertilização *in vitro*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2011.
- Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DNR.** The epididymis and sperm maturation - a perspective. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.361-381, 1993.
- Barreto MAP, Silva JFS, Fagundes B, Caiado JRC, Souza GV, Shimoya A.** Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kda concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Rev Bras Zoot*, v.37, p.2115-2119, 2008.
- Bernardi ML.** Technologies used in the assessment of boar ejaculate to produce high quality semen doses. *Acta Sci Vet*, v.36, p.5-16, 2008.
- Bianchi I, Collares T, Campos VF, Cavalcanti PV, Kaefer C, Corrêa EK, Dellagostin AO, Lucia Jr T, Deschamps JC, Corrêa MN.** Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós-descongelamento. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.60, p.384-388, 2008.
- Bortolozzo FP, Wentz I, Bennemann PE, Bernardi ML, Wollmann EB, Ferreira FM, Neto GB.** Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Copyright, Porto Alegre, Brasil, 185p, 2005.
- Brewis IA, Gadella BM.** Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod*, v. 16, p.68-79, 2010.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM.** A possible role for sperm RNA in early embryo development.



- Theriogenology, v.68, p.147-S155, 2007.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS.** Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, v.31, p.224-238, 1994.
- Caballero I, Vazquez JM, Gil MA, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA.** Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J Androl*, v.25, p.1004-1012, 2004.
- Caballero I, Vásquez JM, Mayor GM, Almiñana C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martinez EA.** PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *J Androl*, v.32, p.505-513, 2009.
- Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M, Töpfer-Petersen E.** The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett*, v.399, p.147-152, 1996.
- Cameron RDA.** Porcine reproduction now and in the future. In: Congress of International Pig Veterinary Society, 15., 1998, Birmingham. Proceedings... Birmingham: IPVS, p.209, 1998.
- Carbonaro M.** Proteomics: present and future in food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, v.15, p.209-216, 2004.
- Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodriguez-Gil JE, Bonet S.** The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*, v.74, p.940-950, 2010.
- Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Martinez EA.** Influence of Porcine 74 Spermadhesins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High Dilution. *Biol Reprod*, v.69, p.640-646, 2003.
- Chen H, Cheung MPL, Chow PH, Cheung ALM, Liu W, O WS.** Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction*, v.124, p.491-499, 2002.
- Collares T, Bongalhardo DC, Deschamps JC, Moreira HLM.** Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction. *Anim Reprod*, v.2, p.11-27, 2005.
- Corrêa MN, Meincke W, Lucia Jr T, Deschamps JC.** Inseminação artificial em suínos. Copyright. Pelotas, Brasil, p.194, 2001.
- Cox J, Mann M.** Is proteomics the new genomics? *Cell*, v.130, p.395-398, 2007.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F.** Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v.63, p.319-341, 2005.
- De Jonge C, Barrat CL.** Gamete donation: a question of anonymity. *Fert Steril*, v.85, p.500-501, 2006.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.
- Della'Aqua Jr JÁ, Papa FO, Zahn FS.** Novo teste hiposmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.189-191, 2002.
- Den Daas JHG, Nieland JD, De Jong G.** The relation between number of spermatozoa inseminated per dose of semen and non-return rates for different sires. *J Dairy Sci*, v.94, p.320-327, 1992.
- Eksted E, Ridderstrale EY.** Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymals of the rabbit. *Acta Anat*, v.143, p.258-264, 1992.
- Eksted E, Ridderstrale Y, Ploen NL, Rodriguez-Martinez, H.** Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymals of the boar. *Acta Anat*, v.141, p.257-261, 1991.
- Elzanaty S, Erenpreiss J, Becker C.** Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia*, v.39, p.60-65, 2007.
- Fukuda A, Osawa T, Oda H, Tanaka T, Toyokuni S, Uchida K.** Oxidative stress response in iron-induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90. *Biochem Biophys Res Comm*, v.219, p.76-81, 1996.
- Gadea J.** Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, p.431-444, 2005.
- Gadella BM.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.229-236, 2008.
- Graham JK.** Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin North Am Equine Practice*, v.12, p.131-147, 1996.
- Harris GC Jr, Goto K.** Carbonic anhydrase activity of the reproductive tract tissues of aged male fowls and its relationship to semen production. *J Reprod Fert*, v.70, p.25-30, 1984.
- Hess EA, Ludwick TM, Teague HS.** Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedures. *J An Sci*, v.19, p.926-931, 1960.
- Jaiswal BS, Conti, M.** Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, v.276, p.31698-31708, 2001.
- Jansen S, Ekhlesi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E.** Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Org*, v.168 p.82-92, 2001.
- Jelínková P, Manásková P, Tichá M, Jonáková V.** Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int J Biol Macromol*, v.32, p.99-107, 2003.



- Jobim MI, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC.** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.61, p.253-266, 2004.
- Johnson LA.** Artificial insemination of swine: fertility with frozen boar sêmen. In: International Pig Veterinary Society Congress, 6., 1980, Copenhagen, Denmark. Proceedings... Copenhagen: University of Copenhagen, 1980. 377p.
- Kraus M, Tichá M, Zelezná B.** Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *J Reprod Immunol*, v.65, p.33-46, 2005.
- Laforest JP, Allard D.** Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. *Reprod Domest Anim*, v.31, p.275-276, 1996.
- Larsson K, Einarsson S, Nicander L.** Influence of thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand*, v.17, p.74-82, 1976.
- Levis D.** Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here. In: International Conference on Boar Semen Preservation. 4., Beltsville, Maryland USA. Proceedings... Lawrence: Allen, p.121-128, 2000.
- Lindquist S.** The heat shock response. *Ann Rev Biochem*, v.55, p.1151-1191, 1986.
- Magargee SF, Kunze E, Hammersted RH.** Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biol Reprod*, v.38, p.667-685, 1988
- Mann T, Lutwak-Mann C.** Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin: Springer-Verlag, p.495, 1981.
- Manella CA.** Introduction: our changing views of mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.32, p.1-4, 2000.
- Mariano MS, Wents I, Guidoni AI, Meincke W.** Concentrações intra e extracelulares de íons sódio, potássio, cálcio, magnésio e zinco em sêmen suíno com diferentes resistências à conservação do estado líquido e ao congelamento. *Rev Bras Reprod Anim*, v.16, p.125-137, 1992.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveita ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.
- Medrano A, Holt WV, Watsib PF.** Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *J Androl*, v.41, p.246-250, 2009.
- Metz KW, Berger T, Clegg ED.** Adsorption of seminal plasma protein by boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.34, p.691-700, 1990.
- Mies Filho A, Hoogstraten MIMJV, Scheid IR.** Cogelabilidade do sêmen suíno. Variação individual. *Rev Bras Reprod Anim*, v.2, p.21-24, 1978.
- Miller DJ, Winer MA, AX RL.** Heparin proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*, v.42, p.899-915, 1990.
- Moura AA, Koc CH, Chapman DA, Killian GA.** Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl*, v.27, p.201-211, 2006.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GA.** A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.169-188, 2007.
- Moura AA, Souza CE, Stanley BA, Champman DA, Killian GJ.** Proteomics of cauda epididymal fluid from mature. *J Proteomics*, v.73, p.2006-2020, 2010.
- Mukai C, Okuno M.** Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, v.71, p.540-547, 2004.
- Myles DG, Koppel DE, Primakoff P.** Sperm surface domains and fertilization. 1990.
- Nagai T.** In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.153-163, 1996.
- Novak S, Ruiz-Sanchez A, Dixon WT, Foxcroft GR, Dyck MK.** Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. *J Androl*, v.31, p.188-200, 2010.
- Ollero M, Bescós O, Cebrián-Pérez, JÁ, Muiño-Blanco T.** Loss of plasma membrane proteins of Bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology*, v.49, p.547-555, 1998.
- Parks JE, Graham JK.** Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- Peltoniemi OAT, Love RJ, Heinonen M, Tuovinen V, Saloniemi H.** Seasonal and management effects on fertility of the sow: a descriptive study. *Anim Reprod Sci*, v.55, p.47-61, 1999.
- Polge C, Smith AU, Parkers AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, v.164, p.666-673, 1949.
- Power MV, Clarke PA, Workman P.** Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP0AA1 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*, v.14, p.250-262, 2008.
- Rath D, Bathgate R, Rodríguez-Martínez H, Roca J, Strzerek J, Waberski D.** Recent advances in boar semen cryopreservation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.66, p.51-66, 2009.
- Reed HCB.** Current use of frozen boar semen - future need of frozen boar semen. In: International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, 1, 1985. Uppsala. Proceedings...Uppsala: Swedish Univ Agric Sci, p.225-227,



1985.

- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vásquez JM, Martínez EA.** Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci*, v.84, p.2692-9, 2006.
- Rocha SL, Neves-Ferreira AG, Trugilho MR, Chapeaurouge A, León IR, Valente RH, Domont GB, Perales J.** Crotalid snake venom subproteomes unraveled by the antiophidic protein DM43. *J Proteome Res*, v.8, p.2351-2360, 2009.
- Roncoletta M, Morani ESC, Rodrigues LH, Silva C. Da, Oliveira MA, Franceschini PH, Ramos PRR.** Comparação do perfil protéico de membrana de espermatozoides do sêmen fresco, diluído e pós-congelação. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.153-167 1999.
- Rossato M, Balercia G, Lucarelli G, Foresta C, Mantero F.** Role of seminal osmolarity in the reduction of human sperm motility. *Int J Androl*, v.25, p.230-235, 2002.
- Santos PM, Teixeira MC, Correia IS.** A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microorganismos. *Bol Biotecnol*, v.77, p.7-17, 2004.
- Saraiva F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodrigues-Martines H.** Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.
- Sanz L, Calvete JJ, Jonkova V, Topfer-Petersen E.** Boar spermadhesins AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor proteins. *Federation of European Biochemical Societies*, v.300, p.63-66, 1992.
- Scheid IR.** Commercial swine artificial insemination in Brasil: Development and current use. *Reprod Domest Anim*, suppl 1, p. 299-302, 1991.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, Bruemmer JE.** Principles of cryopreservations. In: *Cooled and frozen Stallion Semen*, v.9, 1999.
- Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L.** Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol*, v.5, p.279-290, 2005.
- Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S.** Effect of temperature and humidity on reproductive performance of crossbred sows in Thailand. *Theriogenology*, v.65, p.606-628, 2006.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV.** Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters*, v.23, p.255-262, 2002.
- Toniolli R, Medeiros ALN, Figueiredo EL.** Morfologia dos espermatozoides de suíno, diluídos no diluidor de Beltsville (BTS) adicionados do ácido 3-indol acético (IAA). *Rev Ciênc Anim*, v.9, p.61-65, 1999.
- Töpfer-Petersen E, Petrounkina AM, Ekhlesi-Hundrieser M.** Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.653-662, 2000.
- Treu H.** Notas de aula – Curso de Pós graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1975.
- Varela PF, Romero A, Sanz L, Romão MJ, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ.** The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: A zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a cub domain architecture. *J Mol Biol*, v.274, p.635-649, 1997.
- Voet D, Voet JG.** *Bioquímica*. 3.ed. Artmed, p.149-150, 2006.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60-61, p.481-492, 2000.
- Weitze KF.** The use of “long-term extender” in pig AI– a view of the international situation. *Pig News Inform*, v.11, p.23-26, 1990.
- Wilmot I, Polge C.** The freezing of boar spermatozoa. In: *International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*. 7., 1972. Proceeding... Munique, Alemanha, p.1615, 1972.
- Wolders H, Ten Napel J.** Semen in straws. *Pig Int*, v.35, p.10-14, 2005.
- Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato T, Iwamoto T.** Comparative Analysis of Interindividual Variations in the Seminal Plasma Proteome of Fertile Men With Identification of Potential Markers for Azoospermia in Infertile Patients. *J Androl*, v.28, p.858-865, 2007.
-