



Avaliação seminal em suínos: aplicabilidades das análises proteômicas

Semen evaluation in the boar: use of proteomic analyses

Ivan Cunha Bustamante-Filho[‡], Ana Paula Binato de Souza, Franciele Lucca De Lazari,
Laura Espíndola Argenti, Augusto Weber

Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, Univates, Lajeado, RS, Brasil.

Resumo

A adequada análise do sêmen na espécie suína é fator chave para a obtenção da máxima eficiência reprodutiva. Com o avanço tecnológico na avaliação andrológica, a implementação sistemas computadorizados de análise seminal (motilidade espermática, concentração, morfologia e vitalidade celular) já é realidade em muitas centrais de produção de doses inseminantes. Tal evolução permitiu uma melhor categorização dos machos com relação a qualidade seminal e a resistência das doses a preservação por refrigeração. Com isto, abriu-se uma janela de oportunidade para investigar de forma mais apurada os componentes seminais que podem contribuir para a diferenças reprodutivas entre machos. É neste cenário que os estudos em proteômica do sêmen suíno vêm contribuindo para um melhor entendimento dos papéis das proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides na fertilidade de cachaaos. Nesta revisão, serão discutidos os diferentes métodos de aplicação da proteômica na andrologia, bem como as principais proteínas já associadas às características seminais e à fertilidade.

Palavras-chave: suínos, proteômica, plasma seminal, espermatozóide.

Abstract

The proper semen analysis in the boar is a key factor for maximum reproductive efficiency. With the technological advances in andrology, the implementation of computer assisted sperm analyzers (sperm motility, concentration, morphology and cell viability) is a reality in most of the artificial insemination centers. Such evolution allowed a better classification of the sires regarding their seminal quality and resistance to cooling. As a consequence, a window of opportunity opened for a detailed assessment of the seminal components which could influence the reproductive differences among sires. In this scenario, the proteomic studies of the boar semen have been contributing to a better understanding of the roles of seminal plasma and sperm proteins in boar fertility. In this review, the different approaches of proteomics in andrology will be discussed, as well main proteins already associated with seminal characteristics and fertility.

Keywords: swine, proteomics, seminal plasma, spermatozoa.

Introdução

Na cadeia produtiva suinícola brasileira, o uso de inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado é elemento central no manejo reprodutivo das granjas de matrizes. A obtenção de índices bem-sucedidos de fertilidade, por sua vez, depende de uma criteriosa produção de doses inseminantes (Bortolozzo et al., 2015). Para atingir este objetivo, são utilizadas técnicas consagradas de avaliação da qualidade espermática, que são aplicadas como rotina em centrais de produção de sêmen (CPS). A avaliação conjunta da concentração espermática com a motilidade já provê informação valiosa sobre a qualidade espermática (Flowers 1997; Rigau et al., 2001; Vyt et al. 2008). Especialmente, a motilidade progressiva do espermatozoide indica, indiretamente, se existe redução da atividade metabólica e integridade estrutural das células (Johnson et al., 2000), consistindo em um dos principais parâmetros de viabilidade celular utilizado em laboratórios de andrologia (Sancho e Villagran, 2013).

De forma prática, a avaliação da motilidade espermática por microscopia de contraste de fase é rápida e barata, porém é dependente do treinamento do avaliador (Woelders 1991; Tejerina et al., 2008). Salienta-se ainda que a correlação entre motilidade espermática e potencial de fertilização, medidas como taxa de fertilização e taxa de não retorno ao estro em 60 dias, é um tema controverso (Berger et al., 1996; Pérez-Llano et al., 2001; Yeste et al., 2010). Contudo, sua avaliação é fundamental para prever a qualidade seminal. Com o aumento do uso dos sistemas computadorizados de análise seminal (computer-assisted semen analysis, CASA) a acurácia das análises de motilidade, e posteriormente de morfologia e vitalidade espermática, tornaram-se mais objetivas. De fato, os dados mais apurados sobre o movimento espermático, categorizados com base em sua trajetória, velocidade e oscilação de cabeça (Martínez-Pastor et al., 2011), tornaram o CASA um instrumento padrão em qualquer CPS de suínos.

Apesar dos avanços na avaliação andrológica, a predição da fertilidade de ejaculados suínos segue como grande desafio, em especial devido aos fatores associados a fêmea. Considera-se o teste de penetração heteróloga de oócitos como o melhor método de predição do potencial fertilizante de um ejaculado ou dose. Geralmente realizado com oócitos de hamster sem zona pelúcida, este teste apresenta boas taxas de correlação com índices de prenhez.

[‡]Correspondência: ivan.bustamante@pq.cnpq.br

Recebido: 15 de fevereiro de 2019

Aceito: 27 de março de 2019

Todavia, além de custoso e de difícil implementação em rotinas de CPS e granjas comerciais, não oferece muitas informações sobre os mecanismos de interação entre gametas, em especial os dependentes de eventos moleculares, como interação entre proteínas seminais e proteínas de membrana de oócitos e do próprio trato reprodutivo da fêmea (Brown et al., 1990; Zhao et al., 2002; Foxcroft et al., 2008).

Frete a expansão do uso intensivo de IA com sêmen refrigerado na suinocultura, é necessária uma melhor compreensão dos fatores seminais que contribuem para um bem-sucedido manejo reprodutivo. O aperfeiçoamento das técnicas moleculares de análises do sêmen e suas possíveis correlações com parâmetros de qualidade seminal e desempenho na IA podem auxiliar na seleção de machos com maior fertilidade, identificação de machos sub-férteis (Sancho e Villagran, 2013), ou mesmo prever a resistência de um determinado ejaculado a diferentes métodos de preservação seminal. Neste contexto estão as análises proteômicas do plasma seminal e espermatozoide suíno. Estes estudos, além de expandir nosso conhecimento sobre a fisiologia espermática, podem apontar potenciais marcadores proteicos a serem utilizados na rotina de exames andrológicos. Assim, a seguir, serão discutidos os métodos de estudos proteômicos mais utilizados em andrologia suína e serão elencadas proteínas já correlacionadas com parâmetros reprodutivos e possíveis candidatas a marcadores moleculares na espécie.

O sêmen como fonte de marcadores proteicos

As proteínas possuem várias funções no organismo, atuando no controle da maior parte dos processos celulares, podendo atuar como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e sinalizadores celulares (Mann, e Jensen, 2003). A proteômica baseia-se em princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática para quantificar e identificar as proteínas expressas, pois elas se modificam de acordo com o desenvolvimento de um organismo bem como em resposta aos fatores ambientais (Wilkins et al., 1996). Os estudos em proteômica permitem identificar e quantificar marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado. Em relação à andrologia, essa técnica tem sido empregada principalmente para a detecção de marcadores proteicos de fertilidade e qualidade seminal (Moura et al., 2011; Dacheux et al., 2012). Um exemplo de delineamento pode ser observado na figura 1.

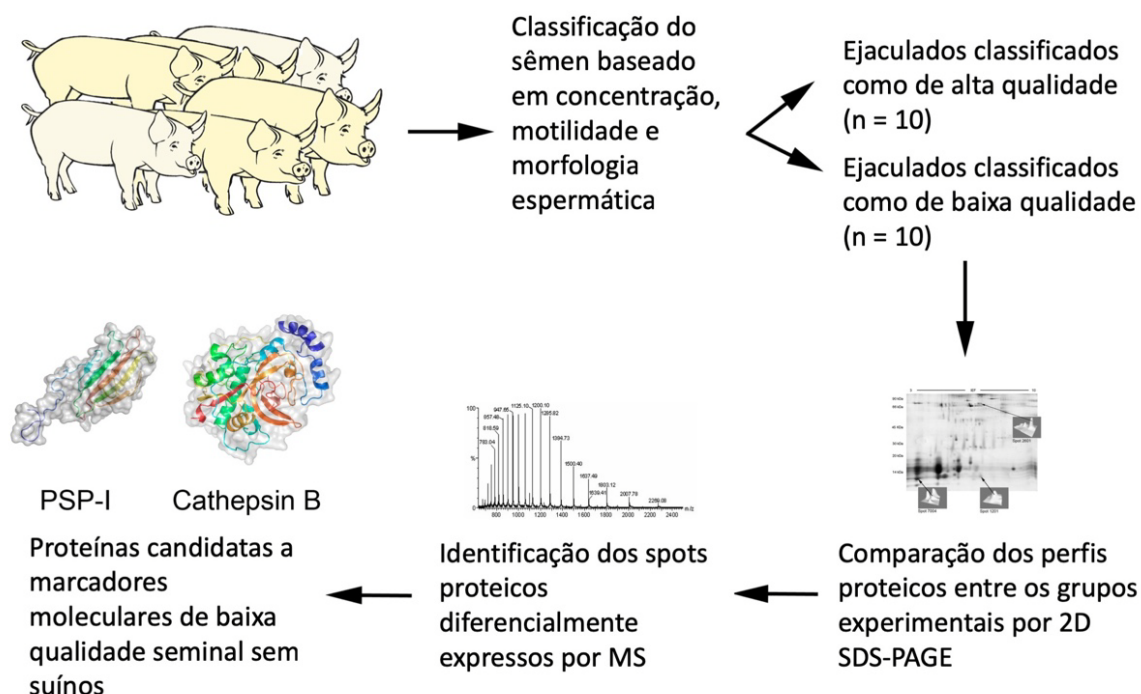


Figura 1. Exemplo de delineamento experimental em estudo de proteômica em andrologia. Os ejaculados proveniente de um grupo de reprodutores é avaliado e classificado conforme os parâmetros seminais obtidos. Desta forma, são formados dois grupos experimentais. O plasma seminal obtido dos ejaculados são comparados utilizando uma das abordagens proteômicas disponíveis, e após a identificação das proteínas associadas com determinada característica reprodutiva, têm-se as proteínas candidatas a marcadores moleculares (Esquema baseado no trabalho de De Lazari et al., 2018).

O desafio do estudo da proteômica seminal está na natureza binária desta matriz biológica. Tanto as

proteínas dos espermatozoides quanto do plasma seminal (PS) participam em todas as etapas da fertilização desde a ejaculação até a interação espermatozoide-oócito (Moura et al., 2011). Os intensos processos de diferenciação celular, incluindo as diferentes etapas de meiose e mitose que ocorrem nos túbulos seminíferos durante a espermatogênese, levam a formação de uma célula altamente especializada onde cada região contribui de forma importante para a habilidade do gameta de fertilizar o oócito. Como consequência, cada região do espermatozoide terá uma composição proteica específica, o que contribui para a sua complexidade. Contudo, não se limita ao resultado final da espermatogênese (Guimarães et al., 2017; Moura et al., 2011).

Destaca-se ainda o fato de o espermatozoide sofrer alterações ao longo do epidídimo que determinam a sua natureza proteica, através da adição e remoção de diversas proteínas fundamentais para função espermática (Dacheux et al., 2005). No final do trânsito e da maturação epididimária, os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo, encontrando-se aptos para serem ejaculados e posteriormente fecundar o oócito (Peña et al., 2015). As alterações pós-traducionais sofridas pelo espermatozoide, como a fosforilação e glicolisação, podem alterar a composição proteica espermática, sendo necessário assim que as metodologias utilizadas para análise proteômica incluam modificações pós-traducionais, como é o caso do MudPIT (Baker, 2016).

Não menos complexo, o PS é uma mistura de secreções provenientes dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias (Caballero et al., 2008). Os componentes bioquímicos são secretados na rede testicular, epidídimo e glândulas sexuais acessórias do trato reprodutivo masculino (Mann e Lutwak-Mann, 1981). A secreção da glândula vesicular constitui a maior parte do PS (Metafora et al., 1989), que possui elementos proteicos exclusivos que também têm participação determinante na capacidade de fertilização do espermatozoide quanto na fisiologia reprodutiva da fêmea (Strzerek et al., 2005).

Os espermatozoides juntam-se ao PS na ejaculação, que servirá como um veículo para o transporte dos gametas (Calvete et al., 1997), além de estar envolvido em vários processos no aparelho reprodutor feminino e masculino durante a reprodução, garantindo a capacidade de fertilização do espermatozoide (Campanero-Rhodes et al., 2005). Vários componentes do PS, incluindo proteínas, citocinas, hormônios sexuais, acompanham a migração dos espermatozoides para o trato reprodutor feminino (Matoušek 1985) e possuem capacidade biológica para proteger os espermatozoides de diferentes patógenos e células de defesa presentes no trato reprodutivo feminino (Maegawa et al., 2002). O PS ainda desempenha um papel imunoregulador que é benéfico para a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutor feminino.

Princípios da aplicação da proteômica na andrologia

As abordagens proteômicas a serem utilizadas devem levar em consideração a separação adequada da fração líquida da fração celular do ejaculado. De forma prática, esta separação é realizada por sequências de centrifugação com baixa velocidade (abaixo de 800 x g), com ou sem o uso de gradientes, objetivando não contaminar o PS com proteínas do espermatozoide e vice e versa. Após a separação, ao plasma seminal deve ser adicionado inibidores de proteases, enzimas que podem rapidamente degradar a amostra, inviabilizando a correta análise proteômica. A fração celular, no entanto, necessita de maior processamento já que, dependendo do objetivo da investigação, pode-se desejar estudar a proteína total da célula ou os compartimentos ou organelas isoladamente. Para tanto, deve-se fazer a escolha adequada do método de lise celular e subfracionamento celular, incluindo etapas de ultracentrifugação, com velocidades acima de 20.000 x g. Após a obtenção do extrato proteico desejado, a adição de inibidores de protease também se faz necessária. Tanto para o estudo de proteínas do espermatozoide quanto do plasma seminal, é indicada a precipitação destas a fim de retirar outras moléculas (lipídios, glicídios, ácidos nucleicos) que podem interferir nas técnicas de separação a serem utilizadas posteriormente.

Os métodos mais utilizados atualmente em estudos de proteômica em andrologia animal são a eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D SDS-PAGE) seguida de espectrometria de massa (MS, do inglês *mass spectrometer*), e a cromatografia líquida acoplada ao MS, também conhecido como *shotgun proteomics* (O'Farrell 1977; Motoyama e Yates, 2008). Apesar do segundo oferecer maiores vantagens, como superior poder de resolução e sensibilidade (ou seja, a identificação de mais proteínas em uma amostra) e menor variabilidade, o uso da 2D SDS-PAGE ainda é comum, em especial devido ao baixo custo em comparação aos sistemas baseados em cromatografia. Um esquema das abordagens proteômicas é apresentado na figura 2.

De forma resumida, os protocolos de proteômica dependem de duas etapas: separação das proteínas e peptídeos e sua posterior identificação. No caso de separação em sistema de gel, as proteínas são separadas em uma matriz de poliacrilamida em dois momentos (O'Farrell et al., 1977). Primeiro, elas são separadas pelo seu ponto isoelétrico, estado em que, em determinado pH, a proteína fica com carga neutra. Em sequência, as proteínas são separadas por massa molecular. O resultado é um perfil em dois eixos (duas dimensões) onde se pode individualizar as proteínas, permitindo a comparação dos perfis proteicos entre amostras e entre grupos experimentais. Em virtude do grande número de géis produzidos, as comparações são normalmente realizadas *in silico*, através de softwares específicos como o PD-Quest 2D (Bio-Rad) e o ImageMaster Platinum 2D (GE Healthcare). Após a identificação dos spots proteicos, estes devem ser excisados dos géis para posterior digestão por tripsina, e identificação dos peptídeos tripticos em espectrômetro de massa. Hoje, estão disponíveis comercialmente diferentes tipos de MS, sendo os mais utilizados do tipo *quadrupole Time-of-flight* (Q-TOF) MS/MS. OS resultados do MS são buscados em bancos de dados de sequências de proteínas e peptídeos, que fazem os alinhamentos que indicaram as proteínas

que possuem as sequências exatas dos fragmentos de peptídeos identificados. Os resultados são apresentados em porcentagem de cobertura da sequência encontrada nos algoritmos dos bancos de dados disponíveis.

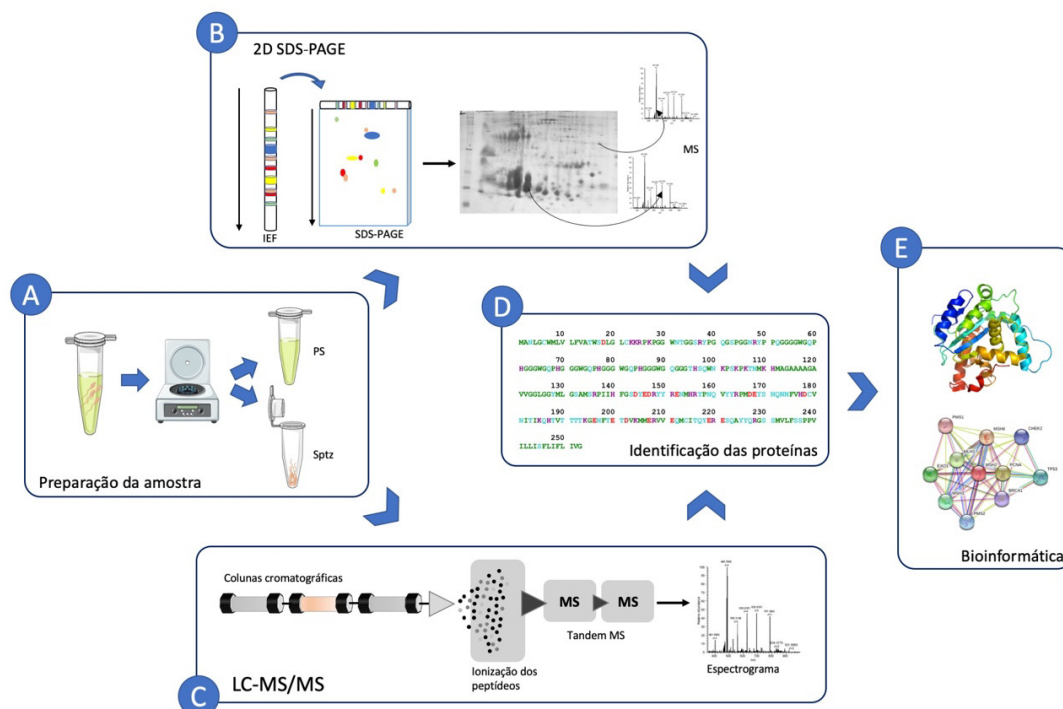


Figura 2. Esquema representando diferentes abordagens para estudo do proteoma seminal. A – A preparação da amostra deve separar o plasma seminal (PS) dos espermatozoides (Sptz) por centrifugação e lavagens em tampões fisiológicos. Após, a amostra pode ser analisada por 2D SDS-PAGE ou cromatografia acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS/MS). B – No 2D SDS-PAGE, as proteínas são separadas pelo ponto isoelétrico (IEF) e após, são resolvidas com base nas suas massas moleculares (SDS-PAGE). Após, as proteínas são excisadas do gel, tripsinizadas e submetidas ao espectrômetro de massa (MS). C - No LC-MS/MS, a amostra já tripsinizada é aplicada em colunas cromatográficas que realizam diferentes níveis de separação, garantindo alta resolução para a posterior leitura nos dois MS colocados em sequência (tandem ou MS/MS). D – Os resultados são introduzidos em algoritmos que identificarão as sequências indicadas nos cromatogramas. E – As proteínas identificadas e suas associações com os fenômenos estudados são avaliadas e relacionadas com a ajuda de softwares de bioinformática.

Os sistemas baseados em cromatografia são mais modernos, com maior capacidade de análise, resultando em maior sensibilidade e especificidade nas leituras realizadas. Alguns equipamentos, inclusive, permitem a leitura de amostras complexas de proteínas digeridas, sendo capazes de identificar 3000 proteínas diferentes em uma amostra que o sistema em gel resolveria aproximadamente 400 a 600. Tal abordagem amplia o conhecimento sobre a composição proteica da amostra, todavia a elevada sensibilidade pode resultar na identificação de proteínas de baixíssima abundância, que podem não ter relevância biológica no contexto estudado. Isto leva a produção de um “ruído” nos dados que podem dificultar a interpretação dos resultados.

Um dos exemplos de *shotgun proteomics* é a Tecnologia de Identificação Multidimensional de Proteínas (MudPIT, do inglês *Multidimensional Protein Identification Technology*). Na análise proteômica pelo método de MudPIT uma coluna microcapilar trifásica de fase reversa, troca forte de cátions e de fase reversa via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é carregada com uma mistura de peptídeos complexa gerada a partir de uma amostra biológica. A coluna microcapilar trifásica é interfaceada diretamente ao MS. Os peptídeos são separados, e eluídos da coluna microcapilar trifásica, sendo diretamente ionizados e analisados no espectrômetro de massa em tandem (MS/MS). Os dados de espectrometria de massa em tandem resultantes são pesquisados utilizando o algoritmo SEQUEST, entre outros, que interpreta os espectros MS/MS gerados e identifica a sequência peptídica a partir da qual foi gerada, resultando na determinação do teor de proteína da amostra original (Washburn et al., 2001).

Com a lista de proteínas encontradas, e identificação das proteínas mais ou menos abundantes nos grupos experimentais avaliados, as funções das proteínas e as possíveis associações com as características amostrais estudadas devem ser cuidadosamente investigadas. A presença de um determinado grupo de proteínas pode explicar o fenômeno estudado devido a suas funções já conhecidas. Diferentes ferramentas de bioinformática oferecem diversas abordagens com base nas proteínas encontradas, relacionando função biológica, atuação em vias celulares e metabólicas, atividade enzimática, interação com outras proteínas entre outros. Uma lista de aplicações de bioinformática é apresentada na Tabela 1.



Tabela 1. Lista com softwares e servidores para análise de dados de proteínas e proteômas.

Software ou servidor	Aplicabilidade	URL
String	Identifica interações proteína-proteína, elaborando redes de interações baseada em achados na literatura	https://string-db.org
Uniprot	Base de dados de proteínas, incluindo função, localização, estrutura entre outras funções	https://www.uniprot.org
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	Base de dados sobre funções de genes e proteínas com foco em biologia de sistemas, incluindo células, organismos e ecossistemas	https://www.genome.jp/kegg/
Interactome3D	Servidor de dados de interação proteína-proteína	https://interactome3d.irbbarcelona.org
Blast2GO	Análises de banco de dados de genes e proteínas, permitindo organizar os dados de acordo com informações de ontologia gênica, entre outras funções	https://www.blast2go.com
SignalP	Identificação de sequências de peptídeo sinal	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
TargetP	Localização subcelular de proteínas, incluindo mitocôndria, cloroplasto, vias secretórias e outras	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP
TMHMM	Verifica se a sequência de aminoácidos resulta na formação de hélices transmembranas	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
Coach	Meta-servidor que prediz se a proteína possui sites de ligação a ligantes	https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COACH/
I-TASSER Online	Servidor de predição de estrutura e função de proteínas	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER
Cytoscape	Plataforma Open source de visualização de redes de interação. Possui vários plug-ins que aumentam sua funcionalidade	https://cytoscape.org



Potenciais marcadores proteicos no plasma seminal suíno

A caracterização de proteínas, presentes no PS de diversas espécies, permite a descoberta de elementos que estão relacionados com a fertilidade e congelabilidade do sêmen (Jobim et al., 2004). Um dos primeiros trabalhos a caracterizar de forma mais abrangente a composição proteica do plasma seminal suíno foi desenvolvido por Gonzalez-Cadavid e colaboradores (2014). Por meio de 2D SDS-PAGE, foram identificadas 39 proteínas diferentes. Mais recentemente, utilizando abordagem shotgun, Perez-Patiño et al. (2018), expandiram este valor para 872 proteínas, sendo 390 pertencendo especificamente a taxonomia *Sus scrofa*.

No PS suíno, destacam-se as proteínas que se ligam à superfície do espermatozoide (espermadesinas) na ejaculação, modulando a atividade de vários aspectos espermáticos (MaňÁsková Jonáková, 2008), podendo estar envolvidas em diferentes etapas do processo de fertilização (Campanero-Rhodes et al., 2005). A família das espermadesinas englobam proteínas de 12-16 kDa (Calvete et al., 1995a), sendo compostas por uma quantidade variável de 109 à 133 aminoácidos (Romero et al., 1997). São proteínas sintetizadas por células epiteliais da vesícula seminal ligadas a membrana plasmática dos espermatozoides do epidídimo durante a ejaculação, possuindo atividade multifuncional e capacidade de ligação com fosfolípidios, inibidores de protease, heparina, glicosaminoglicanos sulfatados, carboidratos (Caballero et al., 2008; TøPfer Petersen et al., 1998). Podem ser encontradas tanto livres no PS, quanto ligadas à superfície de espermatozoides, sendo descritas em mamíferos de importância zootécnica como suínos, bovinos e equinos (Calvete et al., 1995a).

A maior fonte biológica de proteínas espermadesinas suínas é a secreção do epitélio da vesícula seminal, sendo composta por cinco subfamílias que compreendem as proteínas AWN, AQN-1, AQN-3, PSP-1, PSP-2 (Calvete et al., 1995b). As espermadesinas podem ser classificadas como proteínas ligantes à heparina (AQN-1, AQN-3, AWN) e não ligantes à heparina (heterodímero PSP-I/PSP-II; Assreuy et al., 2003). Em cachorros as espermadesinas representam cerca de 75% das proteínas totais (Dostálová et al., 1994). Entretanto González-Cavidad et al. (2014), demonstrou que as espermadesinas compunham cerca de $45.2 \pm 8\%$ das proteínas totais encontradas em amostras de PS suíno.

Os subgrupos PSP-I/PSP-II são encontradas em maior quantidade, possuindo 110 e 116 aminoácidos, respectivamente (Calvete et al., 1995a), e, quando ligadas ao espermatozoide, o heterodímero PSP-I /-II se localiza principalmente na região do acrossoma (Caballero et al., 2006). Além disso, esse complexo contribui para a manutenção espermática com alta viabilidade, atividade mitocondrial e motilidade (Centurion et al., 2003), além de contribuir para a capacidade de penetração no oócito (Caballero et al., 2004). As PSPs modulam a infiltração leucocitária na luz do trato reprodutivo da fêmea após a ejaculação (Caballero et al., 2008). Esta ação demonstra que o heterodímero PSP-I/PSP-II atua como um estimulante da quimiotaxia de leucócitos tanto *in vitro* com *in vivo*, contribuindo para a fagocitose dos espermatozoides, porém não atingindo o reservatório espermático (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Desta forma, a PSP-I/PSP-II são importantes na modulação da atividade imunológica do útero, promovendo a realização de atividades pró- inflamatórias e atividades imunoestimulantes deste complexo de espermadesinas (Assreuy et al., 2003).

Recentemente, De Lazari et al. (2018) identificaram a PSP-I, juntamente com cathepsin B, como candidatos a marcadores de baixa qualidade seminal. Estes resultados foram obtidos na comparação entre as proteínas do plasma seminal de ejaculados com alta qualidade seminal e baixa qualidade seminal. A classificação foi baseada na análise com CASA após a coleta do sêmen, juntamente com a avaliação de concentração, volume e morfologia espermática. Ambas as proteínas estavam presentes em maior abundância nos ejaculados de qualidade inferior, e apresentaram correlação positiva com defeitos maiores e defeitos de cauda.

O subgrupo AWN-1 e AQN-3 são monômeros que realizam ligações específicas com fosfolípidios, formando uma primeira camada de material de revestimento através da interação com a bicamada lipídica da membrana do espermatozoide (Dostálová et al., 1995). A proteína AWN-1 também é sintetizada nos túbulos retos e pela *rete testis* (Sinowitz et al., 1995). Jonáková et al. (2000), verificou que as proteínas AWN-1, AQN-1 e AQN-3 se ligam a zona pelúcida. Assim, é proposto que estas proteínas façam a interação entre as membranas dos dois gametas durante a fertilização (Jansen et al., 2001). A membrana plasmática exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea na manutenção de sua capacidade fertilizante. Durante a fertilização, as proteínas da família das espermadesinas podem influenciar na capacidade de penetração no oócito (Caballero et al., 2004), além de desempenhar diversos papéis favorecendo o espermatozoide na capacitação espermática (Caballero et al., 2008), induzindo o efluxo de colesterol da membrana (Jonáková et al., 2000).

Na tuba uterina, as AWN atingem o oócito da porca *in vivo* após a inseminação promovendo interação entre o oócito e o espermatozoide (Jansen et al., 2001). É caracterizada como uma lectina associada a superfície do espermatozoide, interagindo com a zona pelúcida no momento de fertilização (Calvete et al., 1995a) e são expressas no epidídimo, vesícula seminal e no oviduto (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2002).

As espermadesinas, em especial a AQN-1 e suas formas agregadas, interagem com o epitélio do oviduto, sugerindo contribuição destas na formação do reservatório espermático (Liberda, et al., 2006) que preserva a capacidade de fertilização de espermatozoides e modula a capacitação espermática (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Com relação aos gametas, testes *in vitro* demonstraram a ligação entre proteínas AWN, AQN-1 e AQN-3, com a zona pelúcida (Jonáková et al., 2000). Salienta-se que as proteínas AWN e AQN-3 são integradas aos fosfolípidios da bicamada lipídica da membrana dos espermatozoides, possibilitando a atuação das mesmas na zona



pelúcida (Caballero et al., 2008).

Os trabalhos pioneiros de caracterização do proteoma do plasma seminal suíno abriram portas para estudos funcionais, onde a ocorrência das proteínas pode ser associada a características produtivas. A correlação da expressão de proteínas do plasma seminal suíno com taxa de desmame e tamanho de leitegada foi demonstrada recentemente (Perez-Patiño et al., 2018). A confirmação destes resultados permitirá o desenvolvimento de técnicas mais apuradas de seleção de ejaculados e, talvez, de reprodutores.

A busca por melhores resultados com sêmen suíno congelado tem levado a pesquisadores investigar o possível papel de proteínas do plasma seminal na maior resistência ao congelamento seminal apresentado por alguns machos. Valencia et al. (2017), identificaram que indivíduos classificados como produtores de ejaculados com melhor congelabilidade apresentavam maiores níveis de NPC2, uma proteína secretada no epidídimo, vesícula seminal e próstata (Okamura et al., 1995). Ela é associada com a estrutura lipídica da membrana plasmática, sendo considerada como fator decapacitante (Lassere et al., 2001). Os autores demonstraram ainda associação das proteínas HSP90a e L-PGDS com machos com baixa congelabilidade seminal.

Potenciais marcadores proteicos no espermatozoide suíno

Estudos de proteômica de espermatozoide suíno comprovaram a já esperada complexidade em termos quantitativos e qualitativos. Weber (2016) descreveu 1681 proteínas associadas com diferentes processos celulares, componentes celulares e funções moleculares. Neste estudo, foi analisado o espermatozoide da cauda do epidídimo, ou seja, livre de contaminação por proteínas do PS. Neste local, a célula está pronta para a ejaculação após a passagem e maturação pelo epidídimo. A descrição da composição proteica do espermatozoide retirado da cauda do epidídimo serve para identificar e mapear proteínas específicas, importantes para o metabolismo espermático, concebendo-se assim perspectivas para pesquisas complementares, estudando-se as proteínas individualmente ou em conjunto. A tabela 2 apresenta as 10 proteínas mais abundantes do espermatozoide suíno obtido da cauda do epidídimo.

A proteína mais abundante no espermatozoide retirado da cauda do epidídimo do suíno foi a *Heat Shock Protein (HSP) 70 kDa protein 1 like*. Esta proteína atua nas funções de dobramento e tráfico de proteínas, bem como na inibição da agregação proteica e na degradação proteica (Daugaard et al., 2007). A presença desta proteína no espermatozoide de suínos (Belleannee et al., 2011) e no oviduto de mamíferos sugere uma relação na manutenção da viabilidade espermática e na fertilização (Elliott et al., 2009). Além disso, esta chaperona, com alta conservação evolucionária, atua na motilidade espermática em estudos *in vitro*, ligando-se a superfície do espermatozoide e participando da migração espermática (Hiyama et al., 2014). O aumento nos níveis da HSP70 em espermatozoide congelado de suínos é relacionado com maior criotolerância, protegendo o espermatozoide das alterações causadas pelo congelamento. Além disso, com o aumento do tempo de criopreservação, ocorre aumento nos índices de HSP70. A fosforilação de serinas da HSP 70 pode interferir nos processos de ativação e inativação espermática, alterando assim as taxas metabólicas e o estresse oxidativo (Yeste et al., 2014).

A *acrosin binding protein (ACRBP)*, presente no espermatozoide suíno (Belleannee et al., 2011), está localizada no acrosoma e participa da reação do acrossomo durante a fertilização. Esta etapa é muito complexa e envolve a ativação do acrossomo, ligação e hidrólise da zona pelúcida (Mao e Yang, 2013). As proteínas acrossomais interagem com a zona pelúcida e formam complexos proteicos com alto peso molecular (Kongmanas et al., 2015) cooperando com a penetração espermática (Ferrer et al., 2012). Os níveis da ACRBP podem ser utilizados para o monitoramento da espermatogênese *in vivo* e *in vitro*, bem como marcador molecular espermático e para monitoramentos das funções reprodutivas em ganhos (Kim et al., 2015). Em suínos, a análise da ACRBP e da triosephosphosphate isomerase após a coleta do sêmen pode prever a congelabilidade, podendo ser usada como monitoramento visando otimizar a função reprodutiva (Vilagran et al., 2013). A presença e abundância desta proteína corrobora com a sua importância biológica durante os processos de fertilização.

A proteína *gamma enolase* é a terceira mais abundante neste estudo e a mais abundante entre as proteínas relacionadas com a glicólise. Estes resultados corroboram com Petit et al. (2013) que identificaram a enolase I em humanos, participando da via glicolítica. Em suínos, a alpha enolase foi descrita no espermatozoide (Belleannee et al., 2011), contudo pouco se sabe acerca da sua associação com a fertilidade. Em ratos machos foi observado que defeitos resultantes de um *gene trap* da enolase 4 geram defeitos espermáticos estruturais e infertilidade. Os defeitos, flagelo anormal e peça intermediária incompleta, modificam a morfologia espermática e impactam na motilidade e consequentemente na fertilidade (Nakamura et al., 2013). A abundância desta proteína no presente estudo está relacionada com a sua atividade biológica nas vias glicolíticas, essenciais para a manutenção das funções reprodutivas.

A *phosphatidylethanolamine binding protein* está associada com a superfície da membrana plasmática espermática. Durante o trânsito epididimário, esta proteína, que é secretada pelo testículo e epidídimo, interage com o espermatozoide alterando as taxas de motilidade. A incubação de espermatozoides suínos com *phosphatidylethanolamine binding protein 4* promove a motilidade em estudos *in vitro* (An et al., 2012). O fenômeno de capacitação e decapacitação em camundongos é relacionada com *phosphatidylethanolamine binding protein 1*, visto que ela é associada com alterações na membrana plasmática do espermatozoide na cabeça e flagelo (Gibbons et al., 2005). Esta proteína, quarta mais abundante neste estudo, está relacionada diretamente com a



capacitação espermática, apresentando assim uma importante função biológica.

A *Zona pellucida binding protein* (ZBPB) é uma proteína das espermátides e do espermatozoide, estando presente no acrossoma, participando da interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida. Mutações na ZBPB em humanos estão relacionadas com morfologia anormal da cabeça do espermatozoide, bem como relacionados com teratozoospermia (Yatsenko et al., 2012). A ZBPB é responsável pelas fases iniciais da reação do acrossoma, pela seleção de espermatozoides capacitados e pela prevenção do polispermia em camundongos (Lin et al., 2007), reações muito importantes no processo de interação entre espermatozoide e oócito (Primakoff e Myles, 2002). Os resultados do presente trabalho confirmam os achados do grupo de Dacheux na França, que descreveu a presença desta proteína no espermatozoide suíno (Belleannee et al., 2011).

A *Leucine-rich repeat-containing protein* é uma proteína transmembrana associada com a via de sinalização da proteína G. Recentemente, ela foi descrita como uma proteína moduladora do canal de potássio dependente de voltagem Slo3, que é crítico para a fertilidade (Yang et al., 2011). Além disso, a perda desta proteína afeta o Ksper e estabelece uma séria redução na fertilidade (Zeng et al., 2015). O Ksper é um canal de K⁺, que altera a carga elétrica da membrana, controlando o potencial da membrana e as suas interações (Navarro et al., 2007).

As *Proteins AMP kinase* (AMPK), localizadas no flagelo, estão associadas com a motilidade espermática, visto que uma inibição desta proteína leva a uma potente inibição da motilidade do espermatozoide (Amaral, 2014). Esta proteína, juntamente com o cálcio, modula a via da sinalização, causando um decréscimo na motilidade espermática (Turner, 2006). Em camundongos, a deleção deste gene resulta em infertilidade masculina, sugerindo assim que a motilidade é dependente desta via (Skalhegg et al., 2002). A *AMP kinase* é expressa em espermatozoide suíno em altas concentrações sob condições fisiológicas, participando ativamente da regulação da motilidade (Hurtado de Llera et al., 2012), da manutenção da qualidade espermática ao longo do tempo (Martin-Hidalgo et al., 2013) e da manutenção da organização da membrana plasmática do espermatozoide suíno (Hurtado de Llera et al., 2013). Além disso, a AMPK participa da regulação da função espermática, como a viabilidade, potencial de membrana mitocondrial, integridade da membrana acrosomal externa e fluidez da membrana plasmática (Hurtado de Llera et al., 2015). Estas considerações corroboram com a importância biológica desta proteína e da sua via biológica, bem como de ativador da AMPK, que por atuar diretamente na via, pode alterar o nível metabólico e alterar as taxas de fertilidade (Hurtado de Llera et al., 2015).

A *Alpha-mannosidase* está localizada no acrossomo ou integrada na membrana espermática, estando relacionada com a interação entre espermatozoide e oócito (Kuno et al., 2000). Ela também foi identificada em estudo sobre maturação epididimária na superfície do espermatozoide, corroborando com nossos resultados (Belleannee et al., 2011). Em garanhões, esta proteína é relacionada com a aquisição da motilidade e fertilidade, devido a sua interação direta do espermatozoide com a zona pelúcida (Retamal et al., 2012).

Outras quatro proteínas de membrana foram identificadas em suínos com diferentes respostas seminais ao congelamento. A Fc fragmente of IgG e a lactadherin foram relacionadas a ejaculados com baixa congelabilidade, enquanto a arylsulfatase A e F-actin forma identificadas em maior abundância nas membranas de espermatozoides com maior resistência ao congelamento (Guimarães et al., 2017).

Além do estudo qualitativo e qualitativo do proteoma do espermatozoide suíno, a investigação sobre o efeito das modificações pós-traducionais também pode revelar novos marcadores. Neste sentido, Li et al. (2018), demonstraram que a quantidade de substratos de proteína-quinase A, fosforilação de tirosina e acetilação global de proteínas estão relacionadas com a motilidade espermática, podendo ter efeito na resistência do espermatozoide a preservação a 17°C. Estes estudos mostram que não devemos nos limitar a presença ou ausência de determinadas proteínas, reforçando a complexidade do tema.

Considerações finais e perspectivas

O estudo do proteoma do sêmen suíno teve seus primeiros resultados nas últimas décadas trazendo informações importantes sobre o papel das proteínas seminais. Atualmente, conhecemos aproximadamente 600 proteínas do plasma seminal e 2500 proteínas do espermatozoide, o que nos permite investigar mais profundamente rotas celulares e fisiológicas que possam ter relevância em termos produtivos. A identificação de proteínas relacionadas a parâmetros espermáticos como motilidade, morfologia, metabolismo celular e função mitocondrial, pode viabilizar o desenvolvimento de novas tecnologias diagnósticas. A avaliação molecular do ejaculado poderá tornar mais confiável a avaliação andrológica, impactando positivamente na seleção de ejaculados e na classificação de reprodutores.

Referências

- Amaral A, Paiva C, Attardo Parrinello C, Estanyol JM, Ballecà JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. *J Proteome Res*, v.13, n.12, p.5670-5684, 2014.
- An LP, Maeda T, Sakaue T, Takeuchi K, Yamane T, Du PG, Ogita H. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, v.423, n.4, p.690-696, 2012.



- Assreuy AMS, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RF, Cunha FQ, Ribeiro RA.** Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biol Reprod*, v.68, n.5, p.1836-1841, 2003.
- Baker MA.** Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. *Cell Tissue Res*, v.363, n.1, p.279-287, 2016.
- Belleannee C, Belghazi M, Labas V, Teixeira-Gomes A P, Gatti J L, Dacheux J L, Dacheux F.** Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*, v.11, n.10, p.1952-1964, 2011.
- Berger T, Anderson D L, Penedo M C T.** Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim Reprod Sci*, v.44, n.4, p.231-239, 1996.
- Bortolozzo FP, Menegat MB, Mellagi APG, Bernardi ML, Wentz I.** New artificial insemination technologies for swine. *Reprod Domest Anim*, v.50, n.2, p.80-84, 2015.
- Brown CR, Clarke N, Aiken M, Bavister BD.** Changes in the composition of the hamster zona pellucida after fertilization in vivo but not in vitro. *J Reprod Fertil*, v.90, n.2, p.447-454, 1990.
- Caballero I, Vazquez JM, Gil MA, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Martínez 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, n.6, p.1004-1012, 2004.
- Caballero I, Vázquez JM, García EM, Roca J, Martínez EA, Calvete JJ, Rodríguez-Martínez H.** Immunolocalization and possible functional role of PSP-I/PSP-II heterodimer in highly extended boar spermatozoa. *J Androl*, v.27, n.6, p.766-773, 2006.
- Caballero I, Vazquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Martínez EA.** Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1352-1355, 2008.
- Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Raida M, Sanz L, Töpfer-Petersen E.** Boar spermadhesin PSP-II: Location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS letters*, v.365, n.2, p.179-182, 1995a.
- Calvete JJ, Sanz L, Dostálová Z, Töpfer-Petersen E.** Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertilität*, v.11, p.35-40, 1995b.
- Calvete JJ, Ensslin M, Mburu J, Iborra A, Martínez P, Adermann K, Einarsson S.** Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. *Biol Reprod*, v.57, n.4, p.735-742, 1997.
- Campanero-Rhodes MA, Menéndez M, Sáiz JL, Sanz L, Calvete JJ, Solís D.** Analysis of the stability of the spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer: Effects of Zn²⁺ and acidic pH. *FEBS J*, v. 272, n.21, p.5663-5670, 2005.
- Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Martínez EA.** Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod*, v. 69, n.2, p.640-646, 2003.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti J L, Dacheux F.** Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.319-341, 2005.
- Dacheux JL, Belleannée C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Ecroyd H, Dacheux F.** The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*, v.58, n.4, p.197-210, 2012.
- Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M.** The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters J*, v.581, n.19, p.3702-10, 2007.
- De Lazari F L, Sontag ER, Schneider A, Moura AA, Vasconcelos FR, Nagano CS, Bustamante-Filho IC.** Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility and morphology in boars. *Andrologia*, e13222, 2018.
- Dostálová Z, Calvete J J, Sanz L, Töpfer-Petersen E.** Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, v.1200, n.1, p.48-54, 1994.
- Dostálová Z, Calvete J J, Sanz L, Töpfer-Petersen E.** Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Eur J Biochem*, v.230, n.1, p.329-336, 1995.
- Ekhlesi-Hundrieser M, Sinowatz F, De Wilke IG, Waberski D, Töpfer-Petersen E.** Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol Reprod Dev*, v.61, n.1, p.32-41, 2002.
- Elliott RM, Lloyd RE, Fazeli A, Sostaric E, Georgiou AS, Satake N, Holt WV.** Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction*, v.137, n.2, p.191-203, 2009.
- Ferrer M, Rodriguez H, Zara L, Yu Y, Xu W, Oko R.** MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res*, v.349, n.3, p.881-895, 2012.
- Flowers WL.** Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil Suppl*, v.52, p.67-78, 1997.
- Foxcroft GR, Dyck MK, Ruiz-Sanchez A, Novak S, Dixon WT.** Identifying useable semen. *Theriogenology*, v.70, n.8, p.1324-1336, 2008.
- Gibbons R, Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR.** A mouse sperm decapacitation factor receptor is



- phosphatidylethanolamine-binding protein 1. *Reproduction*, v.130, n.4, p.497-508, 2005.
- González-Cadavid V, Martins JA, Moreno FB, Andrade TS, Santos AC, Monteiro-Moreira ACO, Moura AA.** Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology*, v.82, n.5, p.697-707, 2014.
- Guimarães DB, Barros TB, van Tilburg MF, Martins JA, Moura AA, Moreno FB, Tonioli R.** Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.183, p.27-38, 2017.
- Hiyama G, Matsuzaki M, Mizushima S, Dohra H, Ikegami K, Yoshimura T, Sasanami T.** Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, v.147, n.2, p.167-178, 2014.
- Hurtado de Llera AH, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ.** AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS one*, v.7, n.6, p.e38840, 2012.
- Hurtado de Llera AH, Martin-Hidalgo D, Rodriguez-Gil JE, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ.** AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v.1828, n.9, p.2143-2151, 2013.
- Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ.** AMPK up-activation reduces motility and regulates other functions of boar spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, v.21, n.1, p.31-45, 2015.
- Jansen S, Ekhlesi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E.** Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs*, v.168 p.82-92, 2001.
- Jobim MIM, 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, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC.** Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, n.1-3, p.143-172, 2000.
- Jonáková V, Maňásková P, Kraus M, Liberda J, Tichá M.** Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev*, v.56, n.2, p.275-277, 2000.
- Kim JT, Jung HJ, Song H, Yoon MJ.** Acrosin-binding protein (ACRBP) in the testes of stallions. *Anim Reprod Sci*, v.163, p.179-186, 2015.
- Kongmanas K, Kruevaisayawan H, Saewu A, Sugeng C, Fernandes J, Souda P, Hardy D.** Proteomic characterization of pig sperm anterior head plasma membrane reveals roles of acrosomal proteins in ZP3 binding. *J Cell Physiol*, v.230, n.2, p.449-463, 2015.
- Kuno M, Yonezawa N, Amari S, Hayashi M, Ono Y, Kiss L, Nakano M.** The Presence of a Glycosyl Phosphatidylinositol-Anchored α -Mannosidase in Boar Sperm. *IUBMB life*, v.49, n.6, p.485-489, 2000.
- Lasserre A, Barrozo R, Tezoz JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH.** Human epididymal proteins and sperm function during fertilization: an update. *Biol Res*, v.34, n.3-4, p.165-178, 2001.
- Li P, Yang Q, Li S, Sun H, Liu H, Li B, Li X.** Candidates for reproductive biomarkers: Protein phosphorylation and acetylation positively related to selected parameters of boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci*, v.197, p.67-80, 2018.
- Liberda J, Maňásková P, Prelovská L, Tichá M, Jonáková V.** Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *J Reprod Immunol*, v.71, n.2, p.112-125, 2006.
- Lin YN, Roy A, Yan W, Burns KH, Matzuk MM.** Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol Cell Biol*, v.27, n.19, p.6794-6805, 2007.
- Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, Aono T.** A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol*, v.54, n.1-2, p.33-42, 2002.
- Maňásková P, Jonakova V.** Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *J Reprod Immunol*, v.78, n.1, p.40-48, 2008.
- Mann M, Jensen ON.** Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, v.21, n.3, p.255-261, 2003.
- Mann T, Lutwak-Mann.** Male reproductive function and semen. Berlin: Springer-Verlag, 495p., 1981.
- Mao HT, Yang WX.** Modes of acrosin functioning during fertilization. *Gene*, v.526, n.2, p.75-79, 2013.
- Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, de Paz P.** Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, v.75, n.5, p.783-795, 2011.
- Martin-Hidalgo D, de Llera AH, Yeste M, Gil MC, Bragado MJ, Garcia-Marin LJ.** Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, v.80, n.4, p.285-294, 2013.
- Matoušek J.** Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals. *Anim Reprod Sci*, v.8, n.1-2, p.1-40, 1985.
- Metafora S, Peluso G, Persico P, Ravagnan G, Esposito C, Porta R.** Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochem Pharmacol*, v.38, n.1, p.121-131, 1989.
- Motoyama A, Yates JR 3rd.** Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Anal Chem*, v.80, p.7187-7193, 2008.
- Moura AA, Andrade CR, Souza CEA, Rêgo JPA, Martins JAM, Oliveira RV, Menezes EBS.** Proteínas do



plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.2, p.139-144, 2011.

Nakamura N, Dai Q, Williams J, Goulding EH, Willis WD, Brown PR, Eddy EM. Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility. *Biol Reprod*, v.88, n.4, p.90, 2013.

Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n.18, p.7688-7692, 2007.

O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, v.12, p.1133-1142, 1977.

Okamura N, Tamba M, Liao H J, Onoe S, Sugita Y, Dacheux F, Dacheux JL. Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from porcine corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific α -mannosidase. *Mol Reprod Dev*, v.42, n.2, p.141-148, 1995.

Peña Jr S, Summers P, Gummow B, Paris DB. Oviduct binding ability of porcine spermatozoa develops in the epididymis and can be advanced by incubation with caudal fluid. *Theriogenology*, v.83, n.9, p.1502-13, 2015.

Perez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, v.56, n.3, p.387-398, 2001.

Pérez-Patiño C, Parrilla I, Barranco I, Vergara-Barberan M, Simó-Alfonso E F, Herrero-Martínez J M, Roca J. New In-Depth Analytical Approach of the Porcine Seminal Plasma Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. *J Proteome Res*, v.17, n.3, p.1065-1076, 2018.

Petit FM, Serres C, Bourgeon F, Pineau C, Auer J. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Hum Reprod*, v. 28, n.4, p.852-865, 2013.

Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, v.296, n.5576, p.2183-2185, 2002.

Retamal CA, Dias A JB, Brasil FC, Lanzana FR, López ML. Alpha-mannosidase activity in stallion epididymal fluid and spermatozoa. *Theriogenology*, v.78, n.2, p.252-262, 2012.

Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Pena A, Rodriguez-Gil JE. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, v.56, n.5, p.801-815, 2001.

Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez J M, Calvete J J Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.514-535, 2005.

Romero A, Romão MJ, Varela PF, Kölln I, Dias JM, Carvalho AL, Calvete JJ. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat Struct Biol*, v.4, n.10, p.783-788, 1997.

Sancho S, Vilagran I. The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses. In *Boar reproduction*. Eds Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. Springer: Berlin, Heidelberg, pp.471-516, 2013.

Ská lhogg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight G. Mutation of the Ca subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol*, v.16, n.3, p.630-639, 2002.

Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ, Sanz L, Plendl J. Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract. *Cell Tissue Res*, v.282, n.1, p.175-179, 1995.

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.

Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev*, v.18, n.2, p.25-38, 2006.

Tejerina F, Buranaamnuay K, Saravia F, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology*, v.69, n.9, p.1129-1138, 2008.

Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v.30, n.4-5, p.217-224, 1998.

Valencia J, Gómez G, López W, Mesa H, Henao FJ. Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. *J Anim Sci Biotechnol*, v.8, n.1, p.21, 2017.

Vilagran I, Castillo J, Bonet S, Sancho S, Yeste M, Estanyol J M, Oliva R. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, v.80, n.5, p.443-450, 2013.

Vyt P, Maes D, Quinten C, Rijsselaere T, Deley W, Aerts M, Van Soom A. Detailed motility evaluation of boar semen and its predictive value for reproductive performance in sows. *Vlaams Diergeneeskunding Tijdschrift*, v.77, p.291-298, 2008.

Washburn MP, Wolters D, Yates III JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, v.19, p.242-247, 2001.

Weber A. Maturação espermática no epidídimo suíno: análise proteômica do espermatozoide e regulação hormonal da expressão de β -defensinas (Dissertação de Mestrado), Universidade do vale do Taquari, Lajedo, RS, 2016.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, v.13, n.1, p.19-50, 1996.



- Woelders H.** Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Boar Semen Presevation*, p.145-164, 1991.
- Yang C, Zeng XH, Zhou Y, Xia XM, Lingle CJ.** LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.108, n.48, p.19419-19424, 2011.
- Yatsenko AN, O'neil DS, Roy A, Arias-Mendoza PA, Chen R, Murthy LJ, Matzuk MM.** Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (ZPBP1) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men. *Mol Hum Reprod*, v.18, n.1, p.14-21, 2012.
- Yeste M, Briz M, Pinart E, Sancho S, Bussalleu E, Bonet S.** The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. *Anim Reprod Sci*, v.119, n.3-4, p.265-274, 2010.
- Yeste M, Estrada E, del Álamo MMR, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE.** The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17 C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. *PLoS One*, v.9, n.3, p.e90887, 2014.
- Zeng XH, Yang C, Xia XM, Liu M, Lingle CJ.** SLO3 auxiliary subunit LRRC52 controls gating of sperm KSPER currents and is critical for normal fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.112, n.8, p.2599-604, 2015.
- Zhao XM, Song XX, Kawai Y, Niwa K.** Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *Theriogenology*, v.58, n.5, p.995-1006, 2002.
-