

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GUILHERME ARANTES MENDONÇA

PROTEÔMICA DA MATRIZ NUCLEAR ESPERMÁTICA SUÍNA

UBERLÂNDIA

2015

GUILHERME ARANTES MENDONÇA

PROTEÔMICA DA MATRIZ NUCLEAR ESPERMÁTICA SUÍNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M539p
2015

Mendonça, Guilherme Arantes.
Proteômica da matriz nuclear espermática suína / Guilherme Arantes
Mendonça. - 2015.
55 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Suíno - Reprodução - Teses. 3.
Espermatozoides - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

GUILHERME ARANTES MENDONÇA

PROTEÔMICA DA MATRIZ NUCLEAR ESPERMÁTICA SUÍNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Uberlândia, 15 de julho de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
(Orientador – UFU)

Prof. Dr. José Octavio Jacomini
(Examinador - UFU)

Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos
(Examinador – UNIUBE)

*Aos meus pais Ismael e Marilda, ao meu irmão
Régis, à minha esposa e colega de profissão
Marina, e a todos familiares e amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente àquele que guia meus passos, me abençoa, e me deu a graça de viver, Deus.

Agradeço aos meus pais, Ismael e Marilda por todo o apoio, dedicação, amor e carinho nesta longa jornada até aqui.

Agradeço ao meu irmão Régis por todo o carinho e respeito.

À minha esposa Marina que está ao meu lado há tanto tempo, e divide comigo todos os momentos tristes e alegres, conquistas e perdas, e que sobretudo me apoia, me ama e me respeita.

Agradeço ao idealizador desta pesquisa, meu orientador e amigo, Beletti. Sem suas ideias, dedicação, ensinamentos e paciência nada disso seria possível.

Agradeço a todos meus familiares, amigos e colegas de profissão.

Aos colegas do laboratório de Histologia, Estér, Fabrício, Rosiane, Romualdo, Elisson, Thaís pela ajuda e dedicação.

Aos componentes da banca, Prof. Jacomini e Prof. André Belico, por se disporem de seu tempo, e por contribuírem com suas experiências.

Enfim a todos que participaram direta ou indiretamente de minha vida e que contribuíram de algum modo para meu crescimento.

Obrigado!

*“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós!”*

Chico Xavier

RESUMO

Objetivou-se com este estudo realizar o isolamento e identificação das proteínas da matriz nuclear espermática de um reprodutor suíno. Foi utilizado sêmen de suíno pré-diluído resfriado, obtido de um reprodutor aparentemente saudável, com testes de morfologia e de condensação de cromatina normais, da linha comercial landrace X large White X pietran, com 22 semanas de idade, utilizado normalmente em uma central de inseminação artificial de suínos localizada em Uberlândia, Minas Gerais. O sêmen foi processado para separação das cabeças dos espermatozoides, extração da cromatina e matriz nuclear, quantificação de proteínas e análise por espectrometria de massas (Aparelho LTQ-Orbitrap Elite). A família de proteínas mais abundantes correspondeu às ribossomais (18%), seguida pelas não caracterizadas (15,6%), citoesqueleto (11,4%), histonas (3,8%), subunidades proteossomais (2,8%) e heat shock (1,9%). As outras proteínas foram agrupadas em “outras famílias” e corresponderam a 46,5% do total de proteínas descritas. Foram identificadas 211 proteínas diferentes na amostra, e destas 149 (70,7%) foram previamente descritas como presentes no núcleo espermático ou somático de outras espécies, 29 (13,7%) não têm presença nuclear previamente descrita e 33 (15,6%) foram não caracterizadas. A protamina 2 foi identificada pela primeira vez na espécie suína, no entanto a protamina 1 não foi descrita. Conclui-se que o isolamento das proteínas da matriz nuclear de espermatozoides suíno foi satisfatório, demonstrando que o protocolo utilizado foi eficiente. Algumas famílias de proteínas foram identificadas e descritas. Contudo não foi possível identificar algumas estruturas proteicas. Desta forma este estudo vem contribuir com um catálogo de estruturas proteicas que podem ser úteis em futuros estudos proteômicos.

Palavras-chave: Epigenética; Espermatozoide; Núcleo; *Sus scrofa*.

ABSTRACT

The objective of this study was to perform the isolation and identification of proteins of sperm nuclear matrix of a pig breeder. It was used pre-chilled diluted boar semen obtained from an apparently healthy breeder boar, with normal morphology and chromatin condensation tests, from a commercial line landrace X large white X pietran, with 22 weeks of age, usually used in an artificial insemination central, located in Uberlândia, Minas Gerais. The semen was processed to separate the sperm heads, extraction of chromatin and nuclear matrix, protein quantification and analysis by mass spectrometry (Equipment LTQ-Orbitrap Elite). The most abundant family corresponded of ribosomal proteins (18%), followed by uncharacterized (15,6%), cytoskeleton (11,4%), histones (3,8%), proteasome subunits (2,8%) and heat shock (1,9%). The other proteins were grouped into “other families” and corresponded to 46,5% of total proteins described. Were identified 211 different proteins in the sample and 149 of these (70,7%) have been described previously as present in the somatic or sperm nucleus of other species, 29 (13,7%) did not have nuclear presence previously described and 33 (15,6%) have not been characterized. Protamine 2 was first identified in swine, however protamine 1 has not been described. It follows that the proteins isolation of the nuclear matrix of swine spermatozoid was satisfactory, showing that the protocol used was efficient. Some protein families have been identified and described. However it was not possible to identify some protein structures. Therefore this study contributes to a catalog of protein structures that may be useful in future proteomics studies.

Key-words: Epigenetic; Spermatozoid; Nucleus; *Sus scrofa*.

LISTA DE TABELA E FIGURA

| CAPÍTULO 1 | PÁG |
|-------------------|--|
| FIGURA 1 | Esquema de substituição de histonas por protaminas no núcleo espermático. Em azul encontra-se o DNA e em vermelho as proteínas associadas (modificado de Oliva et al., 2009). |
| | 14 |
| | |
| CAPÍTULO 2 | PÁG |
| FIGURA 2 | Imagem de um espermatozoide suíno normal com relação à compactação da cromatina e morfologia da cabeça, segundo avaliação computacional de esfregaço de sêmen corado com azul de toluidina. |
| | 31 |
| FIGURA 3 | Distribuição das famílias das proteínas identificadas na amostra de cromatina espermática suína. A família de proteínas mais abundante correspondeu às ribossomais, seguida pelas não caracterizadas, citoesqueleto, histonas, subunidades proteossomais e heat shock. |
| | 32 |
| TABELA 1 | Proteínas identificadas em isolados de cromatina nuclear espermática de suínos, contendo massa molecular (Dalton), número de peptídeos, nome do gene associado, descrição, e possível presença nuclear. As famílias estão identificadas pelas cores nas linhas. |
| | 34 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | 07 |
| ABSTRACT..... | 08 |
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. A FORMAÇÃO E A MATURAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE | 13 |
| 3. ESTRUTURA E PROTEÍNAS DA CROMATINA NUCLEAR..... | 15 |
| 4 EPIGENÉTICA..... | 16 |
| 5 O PAPEL DAS PROTEÍNAS CROMATÍNICAS..... | 17 |
| 6. PROTEÔMICA | 18 |
| 7. OBJETIVO | 18 |
| REFERÊNCIAS..... | 19 |
| CAPÍTULO 2- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ NUCLEAR ESPERMÁTICA SUÍNA..... | 22 |
| RESUMO..... | 23 |
| ABSTRACT..... | 24 |
| INTRODUÇÃO..... | 25 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 30 |
| CONCLUSÃO..... | 48 |
| REFERÊNCIAS..... | 49 |
| CAPÍTULO 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 55 |

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

(Redigido de acordo com as normas da Biblioteca - UFU)

1. INTRODUÇÃO

Os espermatozoides são células altamente especializadas e condutoras metabolicamente funcionais do genoma masculino (Beletti, 2013). Durante a espermiogênese e maturação epididimal em mamíferos, a estrutura da cromatina espermática sofre substituição de histonas nucleares por proteínas de transição e protaminas, levando a uma cromatina altamente condensada, a qual é resistente às agressões oxidativas (Fraser e Strzezek, 2007). As protaminas possuem cargas altamente positivas, formando complexos toroidais firmes, organizando de 85-95% do DNA, enquanto que 5-15% da cromatina espermática permanece associada na forma de nucleossomos, como relatado por De Mateo et al. (2011) e Oliva e Ballescá (2012) em humanos.

Fraser e Strzezek (2007) relataram que a estabilização da estrutura da cromatina espermática é reforçada pela presença de componentes do plasma seminal, como os íons de zinco livre e proteínas de ligação ao zinco. Segundos estes mesmos autores a integridade da estrutura da cromatina de espermatozoides é um fator importante para a fecundação e desenvolvimento embrionário, e pode ser afetada por vários fatores, incluindo temperatura e tipo de armazenamento do sêmen em animais.

É bem conhecido que os núcleos de células espermáticas tem a função de fornecer uma sequência de DNA genômico paterno intacta para o ovócito e que as alterações na integridade do DNA são uma das causas de infertilidade humana, principalmente quando relacionada ao macho, levando a perda da gestação. Porém, pouca atenção tem sido dedicada às proteínas associadas ao núcleo de espermatozoides, apesar da sua importância na determinação da estrutura e função da cromatina espermática (De Mateo et al., 2011).

Oliva et al. (2009) identificaram estruturas proteicas nos núcleos dos espermatozoides maduros de humanos, e demonstraram a presença de fatores de transcrição, proteínas de ligação de DNA e proteínas envolvidas no metabolismo da cromatina, em células que em teoria são transcricionalmente inativas. Mais notável foi a presença de enzimas de transcrição, tais como histona-acetiltransferase e desacetilase, histona-etiltransferase, DNA-metiltransferase, topoisomerase, helicase, fatores de transcrição, dedos de zinco, proteínas homeobox, proteínas cromodomínios, proteínas centrosomais, e telomerase. Os mesmo autores levantam uma questão interessante: esses fatores de transcrição e proteínas recém identificadas nos núcleos dos

espermatozoides são remanescentes do processo de espermatogênese ou estão marcando algumas regiões do genoma paterno e têm uma base epigenética?

Uma das primeiras indicações de que algumas proteínas nucleares de espermatozoides poderiam ser cruciais para o desenvolvimento do embrião, foi a descoberta de que, em seres humanos e na maioria dos mamíferos (com a exceção do rato) o centrossoma é herdado do pai (Oliva et al., 2009). Estes mesmos autores demonstraram que RNA's de espermatozoides são transferidos para os óvulos, reforçando a ideia de que para o desenvolvimento embrionário é necessário mais do que o DNA espermático. Desta forma as informações do estudo da proteômica serão muito valiosa no contexto da informação genética, genômica, transcriptômica e metabolômica (Oliva e Castillo, 2011).

Na Medicina Veterinária, o principal método de diagnóstico de fertilidade do macho na rotina clínica é o espermograma, um procedimento clássico que avalia vigor, motilidade, concentração e morfologia espermática. Contudo, esses parâmetros não têm sido suficientes, uma vez que não analisam as estruturas internas da célula espermática, sobretudo, a cromatina (DNA e proteínas específicas), que podem melhor predizer a função dos espermatozoides, como: habilidade de fecundação e desenvolvimento embrionário (Beletti et al., 2004).

Gerar um catálogo de proteínas nucleares de espermatozoides é um importante passo para o esclarecimento da função da cromatina paterna transmitida ao ovócito após a fertilização.

Os catálogos de proteínas identificadas no núcleo de espermatozoides humanos podem ser consultados (De Mateo et al., 2011). Assim este estudo se justifica pelo aspecto teórico e prático na contribuição das informações proteômicas nucleares para a espécie suína.

2. A formação e a maturação do espermatozoide

A espermatogênese é o processo de formação dos espermatozoides, sendo dividida em duas fases: espermatocitogênese e espermiogênese, onde ocorre a transformação de uma espermatogônia diplóide em um espermatozoide haplóide com um núcleo condensado, um acrossoma e um flagelo (Senger, 1999).

A espermatocitogênese consiste de divisões mitóticas e meióticas das espermatogônias e a subsequente manutenção das mesmas (Senger, 1999). As

espermatogônias replicam e se diferenciam em espermatócitos primários que sofrem recombinação genética para dar origem a espermátides haplóides. As espermátides então passam por um processo de diferenciação chamado espermiogênese onde ocorre uma importante remodelação celular, epigenética e cromatínica. Os nucleossomas são desmontados e as histonas são removidas e substituídas pelas protaminas (Figura 1), formando firmes complexos toroidais, organizando 85-95% do DNA espermático humano (Oliva e Castillo, 2011).

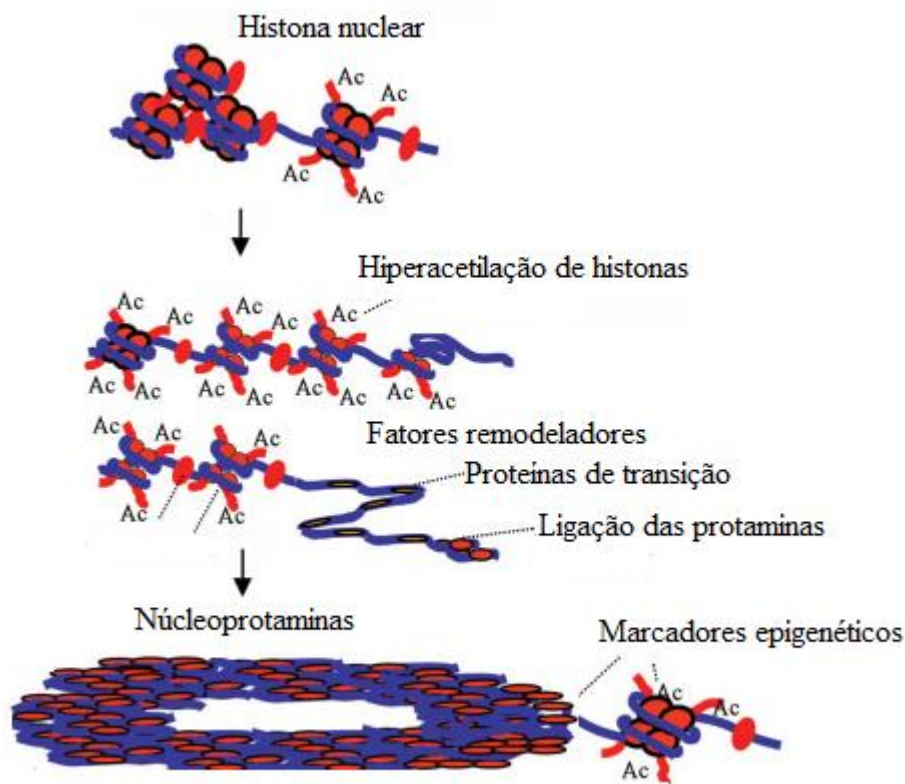


Figura 1: Esquema de substituição de histonas por protaminas no núcleo espermático. Em azul encontra-se o DNA e em vermelho as proteínas associadas (modificado de Oliva et al., 2009).

Na célula a maior parte do citoplasma é removida e um grande flagelo e a vesícula acrossomal são montados. Na sequência os espermatozoides sofrem um processo de maturação por meio de passagem pelo epidídimo, onde a cromatina é mais compactada pela formação de pontes de dissulfeto e pontes de zinco entre as

protaminas, e tem-se a aquisição de membranas e diferentes funcionalidades celulares (Oliva e Castillo, 2011).

Já no trato feminino o espermatozoide sofre um processo que envolve muitas mudanças bioquímicas e fisiológicas, como reação acrossomal e hipermotilidade antes de penetrar o ovócito. Uma vez no ovócito, o pró-núcleo masculino sofre mais um processo de remodelação da cromatina, onde a estrutura nucleoprotamina é desmontada e uma nova estrutura nucleossomal e cromatínica é montada (Oliva e Castillo, 2011).

3. Estrutura e proteínas da cromatina nuclear

Segundo Zhao (2001) as mudanças morfológicas do núcleo se devem às mudanças na organização da cromatina espermática, onde histonas são removidas do DNA das espermatídes e substituídas por proteínas de transição, que por sua vez são substituídas por protaminas, que são as proteínas finais responsáveis pela condensação e estabilização da cromatina. As protaminas interagem com o DNA formando estruturas toroidais (também conhecidas como “Doughnuts”) que variam de 50-100nm, que são um enovelamento do DNA em torno das protaminas (Allen, 1993). Cada toróide contém em torno de 50kb de DNA. Ao final da espermiogênese pode haver mais de 50.000 estruturas toroidais empacotadas no núcleo espermático (Balhorn et al., 2000).

Em contraste com as proteínas de cromatina somática (histonas), as proteínas associadas com o DNA na cromatina espermática (SNBP) apresentam uma maior heterogeneidade de composição, sendo classificadas em três tipos principais: histona (H-tipo), a protamina (P-tipo), e semelhante a protamina (PL-tipo) (Eirín-López e Ausió, 2009).

O H-tipo engloba proteínas cromossômicas que são em termos de composição e estrutura muito semelhantes ao das histonas que se encontram nos tecidos somáticos. Histonas somáticas podem ser classificadas em nucleares (H2A, H2B, H3, H4) e ligantes (H1/H5) (Eirín-López e Ausió, 2009). Os mesmos autores relataram que o P-tipo engloba um grupo de proteínas pequenas, heterogêneas, ricas em arginina ($\text{Arg} \geq 30\% \text{ mol/mol}$), e podem conter cisteína, um aminoácido não normalmente encontrado em outras proteínas cromossômicas. O PL-tipo representa um grupo estrutural e funcionalmente intermediário entre o H-tipo e P-tipo que são relacionados à histona H1.

Oliva e Ballezá (2012) relataram que a distribuição de genes em regiões genômicas organizadas pela protamina e por histonas não é aleatória. As regiões de base

associadas com nucleohistonas estão ligadas a regiões reguladoras de genes, e são significativamente enriquecidas por genes importantes para o desenvolvimento, como genes impressos, microRNAs, genes Hox, promotores e genes de transcrição e de fatores de sinalização. Os mesmos autores mostraram também que as modificações das histonas (H3K4me2, H3K27me3) são atingidas em certos loci associadas com genes de desenvolvimento, e os promotores associados com estes genes são hipometilados no espermatozoide, mas são metilados durante a maturação.

Em adição a esses marcadores, determinados pela distribuição diferencial de genes nos domínios associados à nucleohistonas e nucleoprotaminas, outros tipos de informação epigenética são potencialmente transmitidos pelo núcleo do espermatozoide ao ovócito, como a metilação do DNA. Outra fonte potencial de informação epigenética pode ser a presença de outras proteínas no núcleo do espermatozoide, além de histonas e protaminas (Oliva e Ballescá, 2012).

De Mateo et al. (2011) isolaram núcleos de espermatozoides humanos e extraíram as proteínas e aplicaram a espectometria de massas para identificar 403 proteínas diferentes. As proteínas foram agrupadas de acordo com as partes subcelulares mais abundantes: núcleo, citoplasma, citoesqueleto e suas combinações. As famílias mais abundantes de proteínas foram histonas, seguidas pelas ribossomais, subunidades do proteossoma, desconhecidas ou previstas, citoqueratinas, tubilinas, spanx, hsp e tectinas.

4. Epigenética

Epigenética são variações não genéticas, sendo definida como modificações da expressão gênica, que são herdadas pelas próximas gerações, sem alterar a sequência do DNA (Fantappiè, 2013). O mesmo autor também relatou que por muito tempo considerou-se que os genes eram os únicos responsáveis por passar as características biológicas de uma geração à outra, mas já se sabe que variações adquiridas durante a vida de um organismo podem, com frequência, serem passadas aos seus descendentes sem alteração do DNA. Ainda segundo Fantappiè (2013) a herança epigenética depende de pequenas mudanças químicas no DNA e em proteínas que o envolvem. Existem evidências científicas mostrando que até mesmo os hábitos de vida e o ambiente social em que uma pessoa está inserida podem modificar o funcionamento de seus genes

O termo epigenética compreende diversos mecanismos que participam da regulação de expressão gênica, tais como metilação de DNA, modificações pós-traducionais em histonas, RNA não codificadores. Um fato que desperta muito interesse na comunidade científica é que os processos epigenéticos são potencialmente reversíveis, diferente de alterações genéticas, podendo ser passíveis de tratamento (Silva e Jasiulionis, 2014).

5. O papel das proteínas cromatínicas

As SNBP foram consideradas por muitos anos um grupo de proteínas básicas de pouco interesse, com função estrutural na condensação do DNA nas células germinativas masculinas. Todavia existem evidências que sugerem que estas proteínas também participam de funções importantes relacionadas à fertilidade do macho (Eirín-López e Ausió, 2009).

Pouca atenção tem sido dedicada até agora para as proteínas associadas ao núcleo de espermatozoides, apesar da sua importância na determinação da estrutura e função da cromatina espermática (De Mateo et al., 2011). Já se sabe que o núcleo do espermatozoide transporta um conjunto de informações epigenéticas, que podem ser transferidas para o ovócito e determinar muitos aspectos do desenvolvimento embrionário precoce (Oliva et. al., 2009).

Oliva et al. (2009) relataram que variantes de histonas de núcleos espermáticos humanos contribuem para a formação da cromatina zigótica. Os mesmos autores também relataram haver evidências de que as alterações em algumas das proteínas presentes nos espermatozoides podem estar relacionadas com o desenvolvimento embrionário subsequente. Um exemplo é a presença de protamina anormal complementar em alguns homens inférteis, que se correlacionou com resultados indesejados de reprodução assistida. Estes autores supramencionados mostraram que quebras mediadas por topoisomerase II em espermatozoides podem causar a degradação específica de DNA paterno em ovócitos fertilizados.

Acredita-se que mudanças na arquitetura da cromatina espermática, que é altamente organizada, influenciam a iniciação e regulação da expressão gênica paternal em embriões na fase inicial. O dano na cromatina espermática é associado com uma descondensação anormal, e um longo intervalo até a iniciação da formação do pró-núcleo após fertilização. Esta hipótese pode ser sugerida uma vez que leves

modificações das proteínas nucleares espermáticas por tratamento com dithiothreitol, na presença de um detergente iônico, impossibilitou o núcleo espermático de participar da embriogênese, reforçando a ideia de que modificações nos componentes proteicos são responsáveis por falhas na formação do zigoto (Ward, 2010).

6. Proteômica

"O proteoma de um indivíduo é definido pela soma e a dinâmica de tempo de todas as proteínas que ocorrem durante o tempo de vida desse indivíduo" (Jungblunt et al., 2008). Esta definição inclui a expressão protéica, suas isoformas e suas modificações pós-traducionais (Gilany et al., 2011).

A proteômica visa estudar as proteínas totais expressas em qualquer sistema biológico, ora pela concentração, quantidade, atividade, estrutura, estado de pós-tradução ora pela modificação, além da interação umas com as outras em redes ou complexos (Wright et al., 2012).

O estudo dos parâmetros convencionais de espermatozoides como o espermograma, pode ser de utilidade clínica limitada, porém o estudo proteômico relacionado a estas células pode oferecer grande potencial para o desenvolvimento de novos marcadores de função espermática (Oliva et al., 2009).

Sharma et al. (2013) relatou que avanços nas análises de espectrometria de massas de moléculas presentes nas células espermáticas ampliaram o conhecimento e ajudaram na identificação de proteínas fundamentais. Segundo os mesmos autores estudos tem relatado a presença de proteínas em espermatozoides humanos por meio da implementação de técnicas proteômicas, tais como eletroforese em gel de poliacrilamina, a cromatografia líquida em conjunto com espectrometria de massas (LC-MS/MS), matriz assistida de dessorção a laser e de ionização em tempo de fuga em conjunto com espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS/MS), e a eletroforese bi-dimensional.

7-OBJETIVO

Objetivou-se com este estudo realizar o isolamento e a identificação de proteínas da matriz nuclear espermática suína.

REFERÊNCIAS

ALLEN, M. J.; LEE, C.; LEE J. D.; POGANY, G.C.; BALOOCH, M.; SIEKHAUS, W.J.; BALHORN, R. Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin. **Chromosoma**, Basel, v.102, p.623–630, 1993.

BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroidal stability using single DNA molecules. **Molecular Reproduction and Development**, Rhode Island, v.56, p.230–234, 2000.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v.79, n.1, p.17-23, 2004.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.92-96, 2013.

DE MATEO, S.; CASTILLO, J.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCÁ, J. L.; OLIVA, R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. **Proteomics**, Weinheim, v.11, p.2714–2726, 2011.

EIRÍN-LOPEZ, J. M.; AUSIÓ, J. Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. **BioEssays**, Weinheim, v.31, p.1062–1070, 2009.

FANTAPPIÉ, M. Epigenética e Memória Celular. **Revista Carbone**, Rio de Janeiro, n.3, p.1-5, 2013.

FRASER, F.; STRZEZEK, J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing? **Theriogenology**, Milan, v.68, p.248-257, 2007.

GILANY, K.; LAKPOUR, N.; VAFAKHAH, M.; SADEGHI, M. R. The profile of human sperm proteome; a mini-review. **Journal of Reproduction and Infertility**, Tehran, v.12, n.3, p.193-199, 2011.

JUNGBLUNT, P. R.; HOLZHIITTER, H. G.; APWEILER, R.; SCHLUTER, H. The speciation of the proteome. **Chemistry Central Journal**, London, v.2, n.16, p.1-10, 2008.

OLIVA, R.; BALLESCÁ, J. L. Proteomics of the spermatozoon. **Balkan Journal of Medical Genetics**, Skopje, v.15, p.27-30, 2012.

OLIVA, R.; CASTILLO, J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v.30, p.24-30, 2011.

OLIVA, R.; DE MATEO, S.; ESTANYOL, J. M. Sperm cell proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v.9, p.1004-1017, 2009.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Washington, WS: **Current Conceptions**. 1.ed. Pullman, WA , 272p, 1999.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.66, n.1, p.38-42, 2014.

SHARMA, R.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G.; HAMADA, A. G.; GOPALAN, B.; WILLARD, B.; YADAV, S.; DU PLESSIS, S. Proteomic analysis of human spermatozoa proteins with oxidative stress. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v.11, n.48, p.1-18, 2013.

WARD, W. S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Molecular Human Reproduction**, Grimbergen, v.16, n.1, p.30-36, 2010.

WRIGHTA, P. C.; NOIRELA, J.; OWA, S. Y.; FAZELIB, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, Milan, v.77, p.738-765, 2012.

ZHAO, M.; SHIRLEY, C.R.; YU, Y.E.; MOHAPATRA, B.; ZHANG, Y.; UNNI, E.; DENG, J.M.; ARANGO, N.A.; TERRY, N.H.A.; WEIL, M.M.; RUSSELL, L.D.; BEHRINGER, R.R.; MEISTRICH, M.L. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. **Molecular Cellular Biology**, Washington, n.21, p.7243–7255, 2001.

CAPÍTULO 2

(Redigido de acordo com as normas da ABNT e formato Biblioteca - UFU)

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ NUCLEAR ESPERMÁTICA SUÍNA

RESUMO

Objetivou-se com este estudo realizar uma análise proteômica da matriz nuclear espermática da espécie suína. Foi utilizado sêmen de suíno pré-diluído resfriado, obtido de um reprodutor com testes de morfologia e de condensação de cromatina normais, da linha comercial landrace X large White X pietran, com 22 semanas de idade, utilizado normalmente em uma central de inseminação artificial de suínos localizada em Uberlândia, Minas Gerais. O sêmen foi processado para separação das cabeças dos espermatozoides, extração da cromatina e matriz nuclear, quantificação de proteínas e análise por espectrometria de massas em aparelho LTQ-Orbitap elite. Foram identificadas 211 proteínas diferentes na amostra, e destas 149 (70,7%) foram previamente descritas como presentes no núcleo espermático ou somático de outras espécies, 29 (13,7%) não têm presença nuclear previamente descrita e 33 (15,6%) não caracterizadas. A família de proteínas mais abundante correspondeu às ribossomais (18%, 38 de 211), seguida pelas não caracterizadas (15,6%, 33 de 211), citoesqueleto (11,4%, 24 de 211), histonas (3,8%, 8 de 211), subunidades proteossomais (2,8%, 6 de 211) e heat shock (1,9%, 4 de 211). As outras proteínas foram agrupadas em “outras famílias”, e corresponderam a 46,5% do total (98 de 211). Foi descrito que muitas dessas proteínas desempenham papéis essenciais na maturação da célula espermática e desenvolvimento embrionário. Futuros estudos de variações proteômicas entre animais férteis e sub-férteis podem elucidar questões ainda obscuras no campo da reprodução e melhoramento animal. Pode-se concluir que o método utilizado para isolamento e identificação de proteínas da matriz nuclear espermática de suíno foi eficiente, visto que diversas estruturas proteicas foram identificadas e descritas. Entretanto, não foi possível identificar ao menos uma proteína, a protamina 1.

Palavras-chave: Epigenética; Proteoma; Cromatina; *Sus scrofa*.

ABSTRACT

This study aimed to perform a proteomic analysis of sperm nuclear matrix of swine. It was used pre-chilled diluted boar semen obtained from an apparently healthy breeder boar, with normal morphology and chromatin condensation tests, from a commercial line landrace X large white X pietran, with 22 weeks of age, usually used in an artificial insemination central, located in Uberlândia, Minas Gerais. The semen was processed to separate the sperm heads, extraction of chromatin and nuclear matrix, protein quantification and analysis by mass spectrometry (Equipment LTQ-Orbitrap Elite). Were identified 211 different proteins in the sample and 149 of these (70,7%) have been described previously as present in the somatic or sperm nucleus of other species, 29 (13,7%) did not have nuclear presence previously described and 33 (15,6%) have not been characterized. The most abundant family of proteins corresponded to ribosomal (18%, 38 of 211), followed by uncharacterized (15,6%, 33 of 211), cytoskeleton (11,4%, 24 of 211), histones (3,8%, 8 of 211), proteasome subunits (2,8%, 6 of 211) and heat shock (1,9%, 4 of 211). The other proteins were clustered in “other families”, and accounted for 46,5% of the total (98 of 211). It was reported that many of these proteins play key roles in the maturation of sperm cells and embryonic development. Future studies of proteomic variations between fertile and sub-fertile animals can elucidate even obscure questions in the area of reproduction and animal breeding. It can be concluded that the method used for isolation and identification of pig sperm nuclear matrix proteins was efficient, since different protein structures have been identified and described. However, it was not possible to identify at least one protein, protamine 1.

Key-words: Epigenetic; Proteome; Chromatin; *Sus scrofa*.

INTRODUÇÃO

Há muito tempo se pensava que a única função da célula espermática era transmitir o DNA genômico paterno para a próxima geração. Esta ideia começou a mudar com a descoberta de imprintings sexo-específicos de genes mediados pelas diferenças de metilação do DNA (definido durante gametogênese) e epigeneticamente transmitido para a próxima geração (Oliva e Ballescá, 2012).

Yamauchi et al. (2011) relatou que a condensação do DNA espermático por protaminas deixa apenas uma pequena fração do genoma no espermatozoide que se mantém acessível para as proteínas de ligação de DNA, que são necessárias para ativar a replicação do DNA, e a transcrição de genes. Estes podem ser, de fato, os locais mais importantes para o início da função genômica paterna no embrião inicial. Segundo os mesmos autores estes sítios ativos da cromatina espermática nos toroides de protamina podem conter informações importantes para o embrião em desenvolvimento, chamadas de informações epigenéticas.

Segundo Wright et al. (2012) o emprego isolado de informações genômicas e transcriptômicas pode ser insuficiente para entender por completo um organismo complexo (proteômica e transcriptômica podem ser discordantes, e a relação DNA-RNA pode não ser totalmente correlacionada) e as medições de outros níveis do metabolismo devem também ser obtidas, como o estudo de proteínas. Segundo estes mesmos autores e investigação em grande escala de proteínas em organismos (complemento proteoma-proteína expresso por um "genoma") é igualmente importante, uma vez que fornece informações sobre os reais fatores (enzimas) do processo metabólico. No entanto, ao contrário de outras áreas, como genômica e transcriptômica, a proteômica e suas atuais técnicas e estratégias ainda estão em pleno desenvolvimento.

Os projetos de proteômica relacionados aos estudos de proteínas nucleares em espermatozoides têm possibilitado a criação de catálogos. No entanto, apenas subconjuntos menores das proteínas identificadas são proteínas nucleares (De Mateo et al., 2011). Objetivou-se com este estudo realizar uma análise proteômica (isolamento e identificação de proteínas) da matriz nuclear espermática suína, com o intuito de contribuir com um banco de dados de proteínas nucleares de espermatozoides suínos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra de sêmen e processamento

Foi utilizado sêmen de suíno pré-diluído resfriado, fornecido por uma central de inseminação artificial de suínos localizada em Uberlândia, Minas Gerais. O reprodutor utilizado foi da linhagem comercial landrace X large white X Pietran, com 22 semanas de idade e aparentemente saudável.

À partir dos testes de rotina pelo sistema CASA (Análise Computadorizada de Espermatozoides), o animal apresentou sêmen com motilidade de 93,43 % e motilidade progressiva de 84,11 %. Os defeitos morfológicos, sem considerar gota citoplasmática distal, foram de 2,5 %.

As análises pelo CASA foram realizadas na própria central de inseminação. Com exceção da análise de espectrometria de massas, que foi realizada no Laboratório Veritas Life Sciences, localizado em Ribeirão Preto, São Paulo, todos os outros procedimentos foram realizados no Laboratório de Histologia e Embriologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

Análise de alterações cromatínicas de esfregaço do sêmen corado com azul de toluidina

O sêmen foi avaliado pela técnica de azul de toluidina para verificar se o reprodutor em questão apresentava espermatozoides normais com relação à compactação da cromatina e morfologia da cabeça espermática.

A amostra de sêmen suíno foi fixada utilizando formol citrato (2 gotas de sêmen para 1 mL de formol citrato). Uma gota da amostra foi fixada em dois esfregaços sendo posteriormente secos ao ar em temperatura ambiente. Estes esfregaços passaram por hidrólise ácida em ácido clorídrico 4N por 20 minutos e lavados em água destilada. Após secagem, os esfregaços foram corados com uma gota de azul de toluidina 0,025%, pH 4,0 em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) sobre a lâmina, com posterior colocação de lamínula sobre a mesma, sem a retirada do corante. Passados três minutos foram capturadas 50 imagens digitais em tons de cinza de cada lâmina, usando-se microscópio óptico Leica DM500, acoplado a câmera Leica ICC50, com objetiva de 100x (imersão). As imagens digitais foram usadas para segmentar por limiarização (thresholding) 100 cabeças de espermatozoides de cada lâmina.

A amostra foi analisada por rotinas desenvolvidas em ambiente SCILAB para se obter a média e desvio padrão dos valores de pixel dentro das cabeças de cada imagem. Para se ter uma referência da coloração normal da cabeça do espermatozoide, foram selecionadas automaticamente seis cabeças de espermatozoides em cada esfregaço, sendo elas as de coloração mais homogênea e mais claras, ou seja, as de cromatina mais homogeneamente e intensamente compactada. A média dos valores de píxel destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças padrões). Depois, para cada imagem, as diferenças entre os valores de média de cabeças padrões e valores de média de cada cabeça analisada foram determinadas. Esta diferença foi transformada em porcentagem (% de descompactação) do valor da média das cabeças padrões. O coeficiente de variação (heterogeneidade %) dos níveis de cinza também foi calculado (Beletti et al., 2005).

A avaliação morfométrica da área, perímetro, largura, comprimento, razão largura:comprimento, elipsidade e fator forma de todas as cabeças foram feitas também por rotinas desenvolvidas em ambiente SCILAB. Descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1, F2) foram também considerados para caracterização e análise da forma. A simetria da cabeça espermática também foi considerada. A simetria lateral foi medida para identificação de assimetria ao longo do eixo principal do espermatozoide, que pode implicar em alterações nas propriedades hidrodinâmicas da célula. A mensuração da simetria ântero-posterior foi considerada para identificação de assimetrias ao longo do segundo eixo espermático. Por meio desta medida é possível encontrar algumas alterações específicas como cabeça piriforme e pescoço estreito, entre outras. As simetrias consideradas foram calculadas por meio do “dobramento” do objeto ao longo do eixo maior (ou menor) e depois identificada a área de sobreposição entre as áreas original e dobrada (Beletti et al., 2005).

Separação das cabeças dos espermatozoides

A metodologia para separação das cabeças dos espermatozoides foi modificada de Morandi-Filho (2013). O sêmen resfriado entre 2 e 8 ° celsius foi colocado em tubos de fundo cônico de 15mL contendo 8mL de tampão 50mM Tris-HCl 7,5pH, 1mM EDTA. O frasco foi homogeneizado e centrifugado a 750 x g por 15 minutos a 4°C, seguido de remoção do sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 8 mL do mesmo

tampão, homogeneizado e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido três vezes.

Após a terceira centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 1,5 mL do mesmo tampão. O material foi sonificado em gelo por 10 minutos com pulsos de 30 segundos e intervalos de 5 segundos. Posteriormente o material foi centrifugado a 1000 X g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, e adicionado 2 mL de tampão 50mM Tris-HCl e Sacarose 1,1 M, 7,5pH no material.

Parte deste material foi diluído em 1:100 em água destilada para contagem em câmara de Neubauer, para aferir a concentração das cabeças na amostra, e posteriormente a concentração foi corrigida para 1×10^7 cabeças/mL usando-se tampão 50mM Tris-HCl e sacarose 1,1 M, 7,5pH.

As cabeças foram isoladas das caudas usando ultracentrifugação a 75.600 X g por 45 minutos a 4°C, em um gradiente que consistia de 2mL de cloreto de cério (2,82M de Cério, 25mM de Tris-EDTA, 5mM de MgCl₂ e 0,5% triton X-100) no fundo de um tubo de 12 mL para ultra-centrífuga, sobreposto por 4mL de sacarose 2,2M e recoberto por 2 mL de amostra em tampão 50mM Tris-HCl e sacarose 1,1 M, 7,5pH. Após a centrifugação o sobrenadante contendo as caudas foi retirado cuidadosamente por pipetagem e o sedimento de fundo ressuspensionado com tampão Tris 25mM, e lavado três vezes por centrifugação a 1000 X g por 30 minutos a 4°C em tampão Tris 25mM para se retirar o excesso de cloreto de cério. Após este processo foi feito um esfregão de uma gota da amostra, que foi seca em estufa por 15 minutos, depois corada com xilidina por mais 15 minutos e lavada com água destilada, para avaliar a pureza da amostra em relação à ausência de caudas. A pureza ficou em torno de 95%, segundo avaliação visual em microscopia de luz por meio de contagem de 100 células em um campo.

Extração da cromatina e matriz nuclear

A extração da cromatina e matriz nucleares seguiu a metodologia adaptada de Codrington et al. (2007). As cabeças isoladas foram resuspensionadas em 500µL de solução contendo 1% de Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, e 5µL de coquetel inibidor de protease e foram agitadas com Vortex por 10 minutos em temperatura ambiente. Este tratamento tem função de remover o acrossoma e todas as membranas, deixa o núcleo condensado e ligado ao envoltório nuclear e alguns resquícios de material perinuclear.

As amostras foram lavadas três vezes por centrifugação a 1.100 x g por 30 minutos com 1,5 mL de 50mM Tris-HCl, pH 7,5. Após a última lavagem o material foi ressuscitado em 500 µL de tampão de descondensação que consistiu de 40mM 1,4-ditiotreitol (DTT), 0,25M (NH₄)₂S₄, 25mM Tris-HCl, pH 7,5, e 5µL de coquetel inibidor de protease e permaneceu por 40 minutos em temperatura ambiente. Foi, então, adicionado 4000U de desoxiribonuclease I livre de RNase e homogeneizado por 60 minutos sob vortex em temperatura ambiente. Por fim a amostra foi congelada, liofilizada e guardada em congelador até o processamento de espectrometria de massas.

Quantificação de proteínas

Inicialmente, a amostra liofilizada foi ressuscitada em 100 uL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8.8 contendo uréia 8M. Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método Bradford (1976) com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, cód. 500-0006, Lote L9700067 Rev J). A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA, preparada a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/mL, Sigma, Cód. # P5369-10 mL Lote 110M6005). As amostras foram distribuídas em triplicata em microplacas. A absorbância em 595 nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Por meio de dados obtidos na quantificação, foi estimada a concentração total de proteínas presentes na amostra.

Preparação da amostra

A preparação da amostra para a espectrometria de massas avançada consistiu basicamente de 3 etapas principais: i) redução e alquilação das proteínas, ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina e iii) “clean up/desalting” das amostras. Foi utilizado 38 uL da amostra (50 ug). Em resumo, a amostra foi submetida a redução das pontes de dissulfeto das proteínas pela adição de DTT (ditiotreitol) na proporção de 1mg DTT/mg proteína e incubação por 2 horas em temperatura ambiente seguida da alquilação pela adição de IA (iodoacetamida) na proporção 3 mg IA/mg proteína e incubação por 1 hora em temperatura ambiente, no escuro. O volume da amostra foi diluído 5 vezes em solução de 0,1 M de bicarbonato de amônio pH ≥8,0 obtendo-se um volume final de 500 µL. A amostra foi então incubada com 1 µg de tripsina (Promega, V511A, Lote 30551310) à 37°C durante a noite. Previamente a aplicação da

amostra no espectrômetro de massas foi realizado o “clean-up”/ desalting” da amostra, utilizando-se a coluna OASIS HLB Cartridge 1cc (cat. number: 186000383, Waters), conforme descrição do fabricante. Brevemente, a coluna foi equilibrada com solução acetonitrila 5% contendo ácido fórmico 0,1% e a eluição do material de interesse foi realizada com acetonitrila 80%. A amostra foi em seguida seca em “speed vac” e aplicada em espectrômetro de massas.

Análise por espectrometria de massas

A amostra digerida conforme descrito acima, foi seca e analisada em espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap ELITE (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS). Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS” (Rauch et al., 2006). Os peptídeos identificados foram então agrupados em proteínas, utilizando-se o algoritmo “Protein Prophet” e foi gerada uma lista de identificações com taxa de erro inferior a 2,0%. Foi utilizado um banco de dados geral de todas as espécies (UniProt, 2015).

Análise estatística

Foi feita análise estatística descritiva para os dados apresentados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da cromatina por meio do método azul de toluidina avaliou 195 cabeças de espermatozoides (Figura 2). A média da área da cabeça (μm^2) foi: $43,28 \pm 4,12$; perímetro da cabeça (μm): $21,46 \pm 1,18$; largura da cabeça (μm): $4,20 \pm 0,22$; comprimento (μm): $8,01 \pm 0,56$; largura x comprimento: $0,52 \pm 0,03$; elipsidade: $0,31 \pm 0,02$; fator de forma: $0,91 \pm 0,03$; simetria lateral: $0,97 \pm 0,01$; simetria ântero-posterior: $0,95 \pm 0,01$; descompactação da cromatina (%): $1,95 \pm 1,16$ e heterogeneidade da cromatina (%): $4,43 \pm 1,70$. Estes resultados sugerem que o animal avaliado em questão apresentou espermatozoides normais com relação à compactação da cromatina e morfologia da cabeça espermática (Beletti et al., 2005).



Figura 2. Imagem de um espermatozoide suíno normal com relação à compactação da cromatina e morfologia da cabeça, segundo avaliação computacional de esfregaço de sêmen corado com azul de toluidina.

A família de proteínas mais abundante na amostra de proteínas da matriz nuclear de espermatozoides suínos correspondeu às ribossomais (18%, 38 *de 211*; Figura 3), seguida pelas não caracterizadas (15,6%, 33 *de 211*), citoesqueleto (11,4%, 24 *de 211*), histonas (3,8%, 8 *de 211*), subunidades proteossomais (2,8%, 6 *de 211*) e “heat shock” (1,9%, 4 *de 211*). O restante das proteínas foram agrupadas em outras famílias, e corresponderam a 46,5% do total (98 *de 211*). De Mateo et al. (2011) relataram, após análise proteômica de núcleos de espermatozoides humanos, que as proteínas mais abundantes eram da família das histonas (9,7%), seguida pelas proteínas de citoesqueleto (citoqueratinas, tubulinas e tektinas, somando 8,6%), ribossomais (6,7%), subunidades proteossomais (6,2%), não caracterizadas (6,2%), proteínas spanx (1,7%), heat shock (1,2%). Vale ressaltar que este último autor estudou as proteínas de todo o núcleo espermático humano, e esta pesquisa teve foco nas proteínas da matriz nuclear espermática suína. Entretanto, percebe-se a semelhança entre as famílias identificadas, apesar de pouca semelhança entre as proporções descritas.

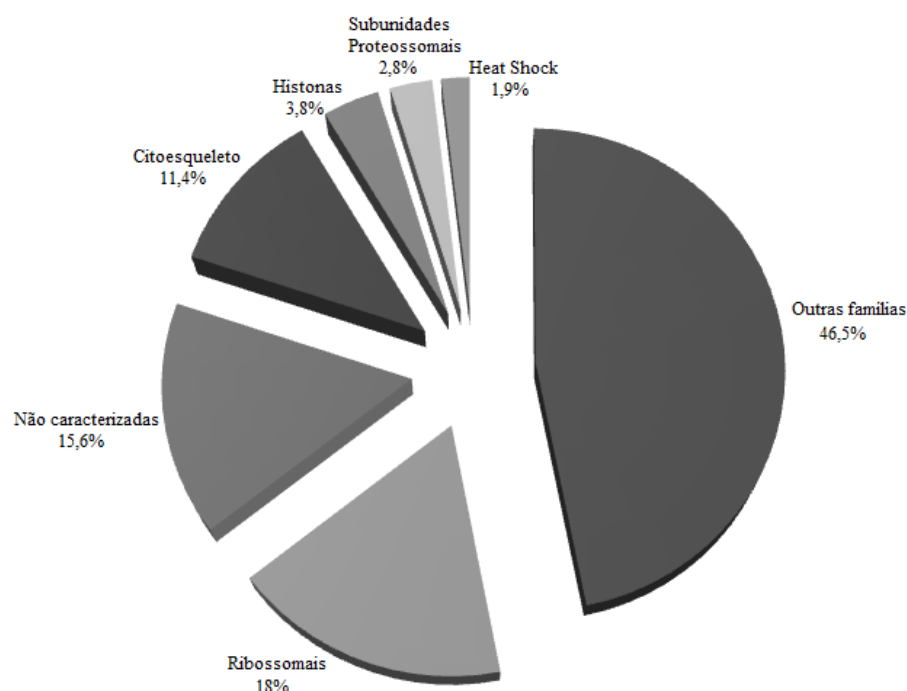


Figura 2. Distribuição das famílias das proteínas identificadas na amostra de cromatina espermática suína. A família de proteínas mais abundante correspondeu às ribossomais, seguida pelas não caracterizadas, citoesqueleto, histonas, subunidades proteossomais e heat shock.

A quantificação de proteínas indicou a concentração de 1,34 mg/mL. Na análise por espectrometria de massas avançada foram identificadas 211 proteínas diferentes na amostra (Tabela 1), e destas 149 (70,7%) foram previamente descritas como presentes no núcleo espermático ou somático de outras espécies (UniProt, 2015), 29 (13,7%) não têm presença nuclear previamente descrita e 33 (15,6%) foram não caracterizadas.

A proteína LOC100626209 foi a proteína com maior número de peptídeos (209), com quase duas vezes mais que a segunda. Esta proteína foi classificada neste estudo em outras famílias e ainda não havia sido descrita em nenhuma espécie, e ainda não se sabe qual sua possível ação. Proteínas não caracterizadas e de alto peso molecular foram descritas no ânulus nuclear de bovinos (Lemos, 2013), podendo indicar que a proteína LOC100626209 esteja presente nesta estrutura. A Proteína FAM71B foi a segunda proteína com maior número de peptídeos (106) nesta pesquisa. Essa proteína já foi identificada em núcleos de espermatozoides humanos e pode estar envolvida na biogênese de RNA (van Koningsbruggen et al., 2007). A terceira proteína com mais peptídeos (89) foi identificada como calicin, também identificada em núcleos

espermáticos humanos, é um possível elemento do citoesqueleto na diferenciação espermiogênica (Bulow et al., 1995).

Fato que chamou atenção nesta pesquisa foi a quarta proteína com maior número de peptídeos encontrada (75), a protamina 2. A protamina 2 é descrita como ausente em núcleos espermáticos de suínos, ao passo que a protamina 1 foi já identificada como presente em diversas espécies de mamíferos, incluindo os suínos (Pirhonen et al., 1994; Andrabi, 2007). Muito embora alguns estudos não tenham identificado a protamina 2 em suínos, já foi relatado que essa proteína é transcrita e traduzida nesta espécie em níveis baixos. Porém, uma deleção de 8 aminoácidos removeria uma sequência a partir do aminoácido terminal da molécula, o que provavelmente teria relevância funcional (Maier et al., 1990).

Tabela 1. Proteínas identificadas em isolados de cromatina nuclear espermática de suíno, contendo massa molecular, número de peptídeos, nome do gene associado, descrição e possível presença nuclear. As famílias estão identificadas pelas cores nas linhas (legendas no final da tabela, onde OF: outras famílias; R: ribossomais; NC: não caracterizadas; C: citoesqueleto; H: histonas; SP: subunidades proteossomais e HS: heat-shock).

| Massa Molecular | Nº peptídeos | Nome gene | Descrição | Presença nuclear |
|-----------------|--------------|--------------|---|------------------|
| 132205 | 209 | LOC100626209 | Não caracterizada | NÃO |
| 62621 | 106 | FAM71B | Proteína FAM71B | SIM |
| 66818 | 84 | CCIN | Calicin | SIM |
| 11807 | 75 | PRM2, PRM2 | Protamina-2 | SIM |
| 49203 | 75 | ACTL7A | Proteína tipo-actina 7A | NÃO |
| 24236 | 69 | RAB2B | Proteína Ras-relacionada Rab-2B | SIM |
| 89681 | 64 | DPY19L2 | Provável C-mannosiltransferase | SIM |
| 49831 | 63 | TUBB4B | Tubulina 4B | SIM |
| 26688 | 61 | RPS3 | Proteína-S3 40S ribossomal | SIM |
| 30629 | 57 | Capzb | Proteína ligante de F-actina, subunidade beta | SIM |
| 27421 | 54 | GSTM3 | Glutathione S-transferase Mu 3 | SIM |
| 41729 | 54 | ACTRT2 | Proteína relacioanda a actina T2 | NÃO |
| 22187 | 51 | GPX4 | Glutathione peroxidase Hidropoxidase fosfolipídica | SIM |
| 35572 | 45 | FNDC8 | Fibronectina Tipo-3 domínio contendo proteína 8 | NÃO |
| 29526 | 44 | ODF1 | Proteína de fibra densa isoforma 1 | NÃO |
| 73174 | 43 | CYLC1 | Cilicina 1 | SIM |
| 36939 | 41 | C1orf56 | Proteína de abertura de leitura da sequência 56, Cromossomo 1 | SIM |
| 198824 | 41 | C2orf16 | Proteína de abertura de leitura da sequência 16, Cromossomo 2 | SIM |
| 50141 | 40 | EEF1A | Fator de alongamento 1-alfa | SIM |
| 87428 | 37 | ODF2 | Proteína de fibra densa isoforma 2 | NÃO |
| 10103 | 36 | | Não caracterizada | NÃO |
| 89288 | 35 | VCP | Proteína ATPase de transição de retículo endoplasmático | SIM |
| 45693 | 35 | ACTL9 | Proteína tipo-actina 9 | SIM |
| 23312 | 34 | C7orf61 | Proteína de abertura de leitura da sequência 61, Cromossomo 7 | SIM |
| 28350 | 32 | SSC.25138 | Não caracterizada | NÃO |
| 34878 | 31 | CAPZA3 | Proteína ligante de F-actina, subunidade alfa-3 | SIM |
| 149547 | 30 | SPATA31D1 | Proteína associada a espermatogênese 31D1 | NÃO |
| 49960 | 29 | LOC100510930 | Não caracterizada | NÃO |
| 41107 | 27 | ACTRT3 | Proteína relacioanda a actina T3 | SIM |

OF R NC C H SP HS

Tabela 1. Continuação

| Massa Molecular | Nº peptídeos | Nome gene | Descrição | Presença nuclear |
|-----------------|--------------|---------------------------|---|------------------|
| 45511 | 22 | ACTL7B | Proteína tipo-actina 7B | SIM |
| 14135 | 22 | HIST1H2AE | Histona H2A | SIM |
| 9469 | 22 | AWN | Não caracterizada | NÃO |
| 36832 | 22 | PPP1CC | Proteína fosfatase Serina/treonina (subunidade gama-catalítica) | SIM |
| 70344 | 21 | HSPA1L | Heat shock 70 kDa tipo-1 | NÃO |
| 44895 | 21 | PGK2 | Fosfoglicerato quinase 2 | SIM |
| 26668 | 21 | TPI1 | Triosefosfatase isomerase | SIM |
| 30596 | 20 | LOC100511361 | Não caracterizada | NÃO |
| 35515 | 20 | PPP1CB | Proteína fosfatase Serina/treonina (subunidade beta-catalítica) | SIM |
| 28726 | 20 | TFAM | Fator de transcrição A | NÃO |
| 13890 | 20 | HIST1H2BN, BH, BD, BB, BF | Histona H2B | SIM |
| 63925 | 18 | FAM71A | Proteína FAM71A | NÃO |
| 40508 | 17 | CYLC2 | Cilicina 2 | SIM |
| 16838 | 16 | LOC100522926 | Não caracterizada | NÃO |
| 42030 | 16 | GLUL | Glutamina sintetase | SIM |
| 39359 | 16 | GAPDHS | Gliceraldeído-3-fosfat desidrogenase S | SIM |
| 19441 | 13 | C17H20orf106 | Proteína de abertura de leitura da sequência 106, Cromossomo 20 | SIM |
| 35460 | 12 | SPEM1 | Proteína de maturação de espermátide 1 | SIM |
| 70252 | 12 | HSPA5 | Proteína reguladora de glicose 78 kDa | SIM |
| 16987 | 12 | HSPB9 | Proteína heat shock beta-9 | SIM |
| 45773 | 12 | FAM71D | Proteína FAM71D | NÃO |
| 14122 | 12 | LOC100519930 | Não caracterizada | NÃO |
| 10960 | 11 | HSPE1 | Proteína Heat Shock 10 KDa | SIM |
| 11829 | 11 | TXN | Tioredoxina | NÃO |
| 37231 | 11 | PCBP2 | Proteína ligante de Poly(rC) 2 | SIM |
| 80207 | 11 | ACSL6 | Ligase 6 cadeia-longa-ácido-graxo-CoA | SIM |
| 17695 | 10 | RPL23A | 60S proteína ribossomal L23A | SIM |
| 16832 | 10 | LOC100517970 | Não caracterizada | NÃO |
| 63479 | 10 | KRT5 | Queratina 5 | SIM |
| 11367 | 10 | H4-I | Histona H4 | SIM |
| 14865 | 10 | RPL23 | 60S proteína ribossomal L23 | SIM |

OF R NC C H SP IHS

Tabela 1. Continuação

| Massa Molecular | Nº peptídeos | Nome gene | Descrição | Presença nuclear |
|-----------------|--------------|---------------|--|------------------|
| 10045 | 10 | LOC100522848 | Não caracterizada | NÃO |
| 53469 | 9 | GC | Não caracterizada | NÃO |
| 24306 | 9 | RPL13 | 60S proteína ribossomal L13 | SIM |
| 32694 | 9 | YBX3 | Proteína ligante de Y-Box | SIM |
| 30101 | 9 | RPL7A | 60S proteína ribossomal 7A | SIM |
| 31998 | 9 | FHL1C | Não caracterizada | NÃO |
| 20810 | 9 | RPL12 | 60S proteína ribossomal 12 | SIM |
| 27519 | 9 | LOC100621642 | Não caracterizada | NÃO |
| 11693 | 8 | RPLP2 | 60S proteína ribossomal 2 | SIM |
| 46109 | 8 | SERPINI2 | Serpin I2 | NÃO |
| 32388 | 8 | WBP2NL | Proteína WBP2NL | NÃO |
| 53000 | 8 | VRK3 | Proteína quinase inativa serina/treonina | SIM |
| 27205 | 8 | LOC100738983 | Não caracterizada | NÃO |
| 27399 | 7 | PSMA6 | Subunidade proteossomal alfa-6 | SIM |
| 20169 | 7 | RANGRF | Fator de liberação de nucleotídeos Ran guanina | SIM |
| 21966 | 7 | PRDX1 | Peroxiredoxina 1 | SIM |
| 37502 | 7 | PCBP1 | Proteína ligante de Poly(rC) 1 | SIM |
| 42644 | 7 | PRR30 | Proteína rica em prolina 30 | NÃO |
| 25594 | 7 | AK3 | Fosfotransferase de GTP:AMP | SIM |
| 145743 | 6 | SF3B1 | Proteína SF3B1 | NÃO |
| 272275 | 6 | FN1 | Proteína FN1 | NÃO |
| 28421 | 6 | RPS6 | 60s proteína ribossomal 6 | SIM |
| 17791 | 6 | LOC100738931 | Não caracterizada | NÃO |
| 22157 | 6 | LOC595122 | Histona tipo H1.3 | SIM |
| 69823 | 6 | HSPA2 | Proteína 2 relacionada a Heat Shock 70 Kda | SIM |
| 51501 | 6 | KRT14 | Queratina 14 | SIM |
| 20252 | 6 | RPL11 | 60s proteína ribossomal 11 | SIM |
| 15816 | 6 | RPS23 | 40s proteína ribossomal 23 | SIM |
| 47919 | 6 | RPL4 | 60s proteína ribossomal 4 | SIM |
| 14719 | 6 | LOC100514544, | Não caracterizada | NÃO |
| 26411 | 5 | PSMA5 | Subunidade proteossomal alfa-5 | SIM |
| 22156 | 5 | LOC100154783 | Não caracterizada | NÃO |
| 13332 | 5 | RPS20 | 40s proteína ribossomal 20 | SIM |
| 15860 | 5 | RPL32 | 60s proteína ribossomal 32 | SIM |
| 27105 | 5 | HDGF | Fator de crescimento derivado de Hepatoma | SIM |
| 159841 | 5 | TN-X | Não caracterizada | NÃO |

OF R NC C H SP LHS

Tabela 1. Continuação

| Massa Molecular | Nº peptídeos | Nome gene | Descrição | Presença nuclear |
|-----------------|--------------|--------------|---|------------------|
| 30604 | 5 | VDAC1P5 | Não caracterizada | NÃO |
| 73702 | 5 | PLCZ | 1- fosfatidilinositol 4,5- bisfosfato fosfodiesterase zeta-1 | SIM |
| 16588 | 5 | LOC100517228 | Não caracterizada | NÃO |
| 59104 | 5 | PDIA2 | Proteína dissulfeto isomerase A2 | NÃO |
| 6825 | 5 | LOC100522509 | Não caracterizada | NÃO |
| 77524 | 5 | KHSRP | Elemento Far Upstream de ligação de proteína 2 | SIM |
| 18431 | 4 | RPS11 | 40s proteína ribossomal 11 | SIM |
| 12784 | 4 | RPL30 | 60s proteína ribossomal 30 | SIM |
| 13739 | 4 | RPS25 | 40s proteína ribossomal 25 | SIM |
| 13282 | 4 | SNRPD1 | Ribonúcleoproteína pequena D1 | SIM |
| 36023 | 4 | YBX1 | Proteína Y-BOX 1 | SIM |
| 15327 | 4 | H3F3A | Histona H3.3 | SIM |
| 40941 | 4 | TSSK2 | Serina quianse 2 Testis- específica | SIM |
| 38116 | 4 | LOC100519387 | Não caracterizada | NÃO |
| 14270 | 4 | LOC100152878 | Histona H2B | SIM |
| 29945 | 4 | RPS3A | 40S proteína ribossomal 3A | SIM |
| 51677 | 4 | MECP2 | Proteína 2 ligante de Metil-CpG | SIM |
| 24798 | 4 | FAM71E1 | Proteína FAM71E1 | NÃO |
| 20688 | 4 | PDAP1 | 28 kDa proteína estável a fosforilação ácida/calor | SIM |
| 62282 | 4 | COIL | Coilina | SIM |
| 41868 | 4 | ACTRT1 | Proteína relacionada a actina T1 | NÃO |
| 19359 | 4 | LOC100737887 | peptidil-prolina cis-trans isomerase | NÃO |
| 34484 | 4 | C9orf24 | Abertura sequência 24, Cromo 9 | SIM |
| 27441 | 4 | LOC100514262 | Não caracterizada | NÃO |
| 61477 | 4 | BAG3 | Família molecular de regulador de chaperona 3 | SIM |
| 52751 | 4 | CDC14B | Proteína fosfatase dual específica | SIM |
| 9096 | 4 | BTF3L4 | Fator de transcrição BTF3 homólogo 4 | SIM |
| 12254 | 3 | RPL36 | 60S proteína ribossomal 36 | SIM |
| 16982 | 3 | CARHSP1 | Proteína 1 estável calor cálcio regulada | SIM |
| 57993 | 3 | KRT10 | Queratina 10 | SIM |
| 57902 | 3 | KRT79 | Queratina 9 | SIM |
| 27928 | 3 | PSMA8 | Subunidade proteossomal alfa-8 | SIM |

OF R NC C H SP LHS

Tabela 1. Continuação

| Massa Molecular | Nº peptídeos | Nome gene | Descrição | Presença nuclear |
|-----------------|--------------|--------------|--|------------------|
| 19256 | 3 | RPL18 | 60S proteína ribossomal 18 | SIM |
| 38082 | 3 | ENO1 | Alfa-Enolase | SIM |
| 14420 | 3 | PARK7 | Proteína DJ-1 | SIM |
| 14227 | 3 | PDCD5 | Proteína de morte celular programada 5 | SIM |
| 15060 | 3 | RPS24 | 40S subunidade ribossomal 24 | SIM |
| 49847 | 3 | UBXN6 | Proteína 6 contendo domínio UBX | SIM |
| 67705 | 3 | FUBP1 | Elemento Far Upstream de ligação de proteína 1 | SIM |
| 15882 | 3 | EEF1D | Fator de alongamento 1-delta | SIM |
| 9442 | 3 | LOC100624171 | Não caracterizada | NÃO |
| 28268 | 3 | H1FNT | Histona H1 testis-específica | SIM |
| 13015 | 3 | RPS26 | 40S subunidade ribossomal 26 | SIM |
| 11207 | 3 | LOC100622916 | Não caracterizada | NÃO |
| 22127 | 3 | RPS7 | 40S subunidade ribossomal 7 | SIM |
| 21388 | 3 | RPL17 | 60S subunidade ribossomal 17 | SIM |
| 33257 | 3 | FAM71F2 | Proteína FAM71F2 | NÃO |
| 47149 | 3 | CCDC159 | Domínio coiled-coil contendo proteína 159 | SIM |
| 16377 | 3 | CCDC58 | Domínio coiled-coil contendo proteína 58 | SIM |
| 18932 | 3 | RPS10 | 40s proteína ribossomal 10 | SIM |
| 35836 | 3 | GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfat desidrogenase | SIM |
| 16495 | 3 | UBE2V1 | Ubiquitina conjugada enzima E2 variante 1 | SIM |
| 13916 | 3 | SNRPD3 | Ribonúcleoproteína pequena D3 | SIM |
| 12738 | 3 | C19orf25 | Proteína de abertura de leitura da sequência 25, Cromossomo 19 | SIM |
| 15300 | 2 | TNP2, TNP2 | Proteína de transição nuclear 2 | SIM |
| 33692 | 2 | HNRNPC | Ribonúcleoproteína heterogênea C | SIM |
| 49257 | 2 | HNRNPK | Ribonúcleoproteína heterogênea K | SIM |
| 42009 | 2 | ACTA2 | Actina alfa 2 | NÃO |
| 14759 | 2 | RPL22 | 60S proteína ribossomal 22 | SIM |
| 32404 | 2 | ASRGL1 | Não caracterizada | NÃO |
| 17266 | 2 | PRDX5 | Peroxidoxina 5 | NÃO |
| 28658 | 2 | LOC100155139 | Subunidade proteossomal beta | SIM |
| 151110 | 2 | ACIN1 | Acinus | SIM |
| 29484 | 2 | PSMA4 | Subunidade proteossomal alfa 4 | SIM |
| 32190 | 2 | RPL6 | 60S proteína ribossomal 6 | SIM |
| 21378 | 2 | IQCF5 | Domínio IQ contendo proteína F-5 | NÃO |

OF R NC C H SP LHS

Tabela 1. Continuação

| Massa Molecular | Nº peptídeos | Nome gene | Descrição | Presença nuclear |
|-----------------|--------------|------------------|--|------------------|
| 21248 | 2 | RPS3 | 40S proteína ribossomal 3 | SIM |
| 48197 | 2 | LOC100739434 | Não caracterizada | NÃO |
| 135902 | 2 | AHNAK | Proteína associada a diferenciação de neuroblastos | NÃO |
| 17232 | 2 | CENPV | Proteína centromérica V | SIM |
| 12441 | 2 | RPL36A | 60S proteína ribossomal 36A | SIM |
| 26047 | 2 | RPL18A | 60S proteína ribossomal 18A | SIM |
| 89391 | 2 | PPP1R9B | Neurabina 2 | SIM |
| 35431 | 2 | DECR1 | 2,4-dienoil-CoA redutase | SIM |
| 15097 | 2 | RPS19 | 40S proteína ribossomal | SIM |
| 12423 | 2 | LOC100519900 | Não caracterizada | NÃO |
| 32953 | 2 | PSMG1 | Subunidade proteossomal G1 | SIM |
| 57160 | 2 | C17orf74 | Abertura da sequência 74, Cromo 17 | SIM |
| 5970 | 2 | MT2A, MT1E | Metalotioneína-2A /1E | SIM |
| 39591 | 2 | CXorf66 | Proteína de abertura de leitura da sequência 66, Cromossomo X | SIM |
| 19660 | 2 | LOC100522904 | Não caracterizada | NÃO |
| 31591 | 2 | LDHC, LDHA, LDHB | L-lactato desidrogenase C, A, B | SIM |
| 24423 | 2 | RAN | Proteína nuclear ligante de GTP | SIM |
| 7841 | 2 | RPS28 | 40S proteína ribossomal 28 | SIM |
| 4312 | 2 | LOC100525679 | Não caracterizada | NÃO |
| 33347 | 2 | RBMX | Proteína 2 padrão de ligação ao RNA, ligado ao cromossomo X | SIM |
| 84967 | 2 | SF3A1 | Fator de splicing 3 A subunidade 1 | SIM |
| 14728 | 2 | UBA52, UBB, UBC | Ubiquitina-60s proteína ribossomal L40, Ubiquitina, Poliubiquitina C | NÃO |
| 20972 | 2 | PEBP1 | Fosfatidiletanolamina ligante de proteína 1 | SIM |
| 10350 | 2 | DYNLL2 | Dineína de cadeia curta 2 | SIM |
| 50020 | 1 | KRT28 | Queratina 28 | SIM |
| 49417 | 1 | KRT15 | Queratina 15 | SIM |
| 65109 | 1 | KRT75 | Queratina 75 | SIM |
| 57113 | 1 | KRT4 | Queratina 4 | SIM |
| 54427 | 1 | KRT8 | Queratina 8 | SIM |
| 40202 | 1 | PGK1, PGK1, PGK1 | Fosfoglicerato quinase 1 | SIM |
| 13377 | 1 | H2AFV | Fragmento Histona H2A | SIM |

OF R NC C H SP IHS

Tabela 1. Continuação

| Massa Molecular | Nº peptídeos | Nome gene | Descrição | Presença nuclear |
|-----------------|--------------|--------------|---|------------------|
| 47130 | 1 | ENO3 | Beta-enolase 3 | SIM |
| 48977 | 1 | DLST | Dihidrolipoilisina-reíduo succiniltransferase componente de complexo 2-oxoglutarato desidrogenase | SIM |
| 87445 | 1 | PHTF1 | Homeodomínio Putativo fator de transcrição 1 | SIM |
| 8550 | 1 | CHTOP | Marcador cromatínico Protamina 1 | SIM |
| 14099 | 1 | RPL31 | 60s proteína ribossomal 31 | SIM |
| 94733 | 1 | MATR3 | Matrin 3 | SIM |
| 36135 | 1 | ELAVL1 | ELAV tipo 1 | SIM |
| 27206 | 1 | LOC100519489 | Não caracterizada | NÃO |
| 56664 | 1 | LOC100620428 | Não caracterizada | NÃO |
| 81382 | 1 | CC2D1B | Domínio coiled-coil e domínio C2 contendo proteína 1B | SIM |
| 24416 | 1 | LOC100525255 | Não caracterizada | NÃO |
| 30211 | 1 | TSSK6 | Serina Quinase testis-específica 6 | SIM |
| 153433 | 1 | BRD4 | Proteína BRD4 | NÃO |
| 22022 | 1 | LOC100152612 | Peptidil-prolina cis-trans isomerase | SIM |
| 29598 | 1 | RPS4 | 40S proteína ribossomal 4 | SIM |
| 48074 | 1 | pdi-p5 | Proteína dissulfeto isomerase P5 | NÃO |
| 28677 | 1 | PGAM2 | Fosfoglicerato mutase 2 | SIM |
| 23726 | 1 | SARNP | SAP-domínio ribonucleoproteína | SIM |

OF R NC C H SP HS

Neste estudo foi detectado um peptídeo da proteína CHTOP, que é responsável pela marcação cromatínica de protamina 1, apesar desta última proteína não ter sido identificada.

Nos resultados apresentados foi possível verificar a ausência de protamina 1, sendo que este resultado também foi encontrado por De Mateo et al. (2011) ao avaliar núcleo de espermatozoides humanos. Por conseguinte no mesmo trabalho os autores relataram que a protamina 2 esteve presente entre as proteínas nucleares básicas, como também demonstrado no presente trabalho. Os mesmos autores descreveram ainda que a razão para a falta de detecção de protamina 1 pode ser sua composição particular de aminoácidos. As protaminas são proteínas básicas altamente ricas em lisina e arginina (mais de 50% nas formas maduras), e a tripsina cliva cadeias peptídicas, principalmente, no lado carboxilo dos aminoácidos lisina ou arginina, resultando em fragmentos de

péptido muito pequenos, não sendo possível sua detecção nas condições utilizadas em espectrometria de massas. Esta limitação é, particularmente, importante para a protamina 1 uma vez que é mais rica em arginina do que a protamina 2.

De acordo com Engel et al. (1992) os genes para as duas protaminas (PRM1 e PRM2) e para duas proteínas de transição (TNP1 e TNP2) foram caracterizados em várias espécies de mamíferos. Segundo os mesmos autores no ser humano, suíno e touro os genes para PRM1, PRM2 e TNP2 estão intimamente ligados ao longo de um trecho de DNA específico, e o gene para TNP1 em todas as espécies estudadas está localizado em outro cromossomo.

Proteínas relacionadas ao ribonucleossoma foram identificadas na amostra estudada. Proteínas 40S ribossomais como a RPS3 apresentaram 61 peptídeos na amostra, e outras 14 variantes apresentaram entre 1 e 6 peptídeos. Vale ressaltar que De Mateo et al. (2011) avaliou o proteoma nuclear de espermatozoides humanos e também relatou proteínas 40s ribossomais, como a RPS2, RPS25, RPS3A, RPS6, RPS7 e RPS9.

Proteínas 60S ribossomais também foram identificadas na amostra. A RPL23 e a RPL23A apresentaram 10 peptídeos cada, enquanto outras 16 proteínas 60S ribossomais apareceram variando entre um e nove peptídeos. De Mateo et al. (2011) também descreveram proteínas 60s ribossomais em núcleos espermáticos humanos, como a RPL10L, RPL3 e RPL9, comprovando a presença desta última proteína no núcleo espermático humano também por meio de técnica de imunofluorescência.

A análise proteômica dos núcleos espermáticos isolados indica apenas a presença de proteínas ribossomais citoplasmáticas (80S (60S+40S)), mas não proteínas ribossômicas mitocondriais (55S). Assim, a detecção de proteínas ribossomais citoplasmáticas no presente estudo seria consistente com a tradução citoplasmática proposta por Lambard et al. (2004) e Galeraud-Denis et al. (2007) e De Mateo et al. 2011. As proteínas ribossomais são reconhecidas, portanto, como proteínas citoplasmáticas, e sua detecção nos núcleos espermáticos suínos se torna um achado importante para esclarecer ações epigenéticas paternas para a espécie suína.

A proteína ligante de F-actina, subunidade beta (Capzb) apresentou 57 peptídeos e pode desempenhar um papel na regulação da morfologia celular e organização do citoesqueleto, segundo pesquisa em ratos (Geyer et al., 2009).

A proteína de abertura de leitura da sequência 56 do cromossomo 1 (C1orf56) com 41 peptídeos na amostra pode estar envolvida no controle da proliferação celular.

Esta proteína é uma modificadora oncogênica que contribui para a função supressora de tumores de DNMT3B. Esta última é essencial para a metilação do DNA durante o desenvolvimento (Hlady et al., 2012).

As proteínas com características de Histonas foram encontradas na amostra de estudo. Dentre elas a HIST1H2AE uma histona H2A de 22 peptídeos, a H2B com 20 peptídeos. Uma variante de histona H4 com 10 peptídeos, uma histona H1 tipo 3 com 6 peptídeos, e uma histona H3.3 com 4 peptídeos foram também identificadas, assim como uma variante de histona H2B com 4 peptídeos, histona H1 testículo-específica com 3 peptídeos e um fragmento de histona H2A. Segundo Biterge e Schneider (2014) as histonas são componentes estruturais de 5 a 15% da cromatina espermática e que o DNA eucariótico está enrolado em torno de um octâmero de histonas nucleares H2A, H2B, H3, e H4.

Ainda de acordo com Biterge e Schneider (2014) as diferenças estruturais de variantes nucleares de histonas afetam as interações entre proteínas histonas no nucleossoma, consequentemente, a sua estabilidade, bem como a conformação cromatínica aberta ou compacta. Por exemplo, as variantes de histona H2A.Z e H3.3 estão, principalmente, relacionadas com uma conformação da cromatina aberta e atividade de transcrição, enquanto a macroH2A estabiliza o nucleossoma e é muitas vezes associada a uma cromatina em estado repressivo.

Concomitante com alterações visíveis na organização da cromatina espermática, as histonas seriam removidas a partir do DNA de espermátócitos e espermátides iniciais e substituídas por proteínas de transição. Em sequência as proteínas de transição são substituídas por protaminas que são responsáveis para a condensação final e estabilização da cromatina espermática (D'Occhio et al., 2007). O mesmo autor relatou que em seres humanos e outros mamíferos pode ocorrer persistência de histonas em espermatozoides maduros ejaculados, como demonstrado nesta pesquisa para diversos tipos de histonas. À medida que a retenção de histonas é relacionada a uma falta de processamento de protamina 2, foi sugerido que a retenção de histona não é um evento normal e resulta em instabilidade da cromatina espermática. No entanto, também foi relatado que histonas remanescentes estão localizadas dentro de regiões específicas da cromatina e identificam os genes que são preferencialmente ativados durante o desenvolvimento embrionário inicial (D'Occhio et al., 2007).

A proteína PPP1CC (22 peptídeos) foi encontrada na amostra, condizendo com os resultados descritos por De Mateo et al. (2011). É uma fosfatase indispensável na espermatogênese. A deleção do gene desta proteína causa em ratos a perda generalizada de desenvolvimento de células germinativas, mais proeminente a partir das fases seguintes de alongamento das espermátides. As células germinativas sobreviventes exibem várias alterações, incluindo defeitos de condensação da cromatina e biogênese acrossomal (MacLeod et al., 2014).

Uma importante proteína nuclear identificada foi a WBP2NL com 8 peptídeos na amostra. Esta proteína foi identificada em ratos, onde pode desempenhar um papel na retomada meiótica e na formação do pronúcleo masculino (Chen et al., 2014), portanto está relacionada com o desenvolvimento embrionário inicial.

As proteínas de subunidades proteossomais foram identificadas na amostra. A PSMA6 apresentou 7 peptídeos, a PMSA5 apareceu com 5 peptídeos, PSMA8 com 3 peptídeos, PSMA4, PSMG1 e LOC100155139 (subunidade proteossomal beta) com 2 peptídeos cada. De Mateo et al. (2011) relataram 25 proteínas de subunidades proteossomais diferentes em núcleos de espermatozoides humanos, dentre elas vale destacar PSMA4, 5, 6 e 8 também identificadas nesta pesquisa. Com relação às funções dessas proteínas Zhong e Belote (2007) relataram que elas são a “máquina proteica” de degradação da via proteolítica mediada por ubiquitina, que tem sido implicada em muitos processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, a regulação da transcrição, transdução de sinal, e determinação do “destino” da célula.

Outras proteínas relevantes para o metabolismo da matriz nuclear dos espermatozoides são a SNRPD3 e a SNRPD1, que também foram identificadas na matriz nuclear de espermatozoide suíno com 3 e 4 peptídeos cada, respectivamente. De Mateo et al. (2011) também identificaram a SNRPD1 ao analisar núcleo de espermatozoide humano. Essas proteínas são classificadas como ribonucleoproteínas nucleares pequenas, e representam os principais blocos de construção do spliceossoma maior e menor e, portanto, constituem fatores essenciais no splicing de todos os pré-RNAs celulares (Grimm et al., 2013).

A Proteína YBX-1 foi identificada com 4 peptídeos na amostra de sêmen de suíno analisada. Segundo Dhawan et al. (2012) esta proteína liga-se ao RNA e participa de diversas etapas da biogênese de RNAs, entre elas a transcrição, o processamento e o transporte do núcleo para o citoplasma, onde pode regular a localização, tradução, e

estabilidade do RNA. Estes mesmos autores relataram que a YBX-1 funciona também como uma proteína estrutural envolvida na organização espacial das proteínas do RNAm, e que a deleção de YBX-1 induz um fenótipo letal em embriões precoces. Tal fato sugere um papel crítico para esta proteína durante o desenvolvimento embrionário.

A proteína MECP2 foi descrita na amostra contendo 4 peptídeos. Segundo D'Esposito et al. (1996) esta proteína é essencial para a metilação de resíduos de citosina em genomas de mamíferos, e está associada com a repressão da transcrição e da cromatina inativa. Estes mesmos autores demonstraram que a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento de ratos, possivelmente por meio da prevenção da expressão inapropriada de genes.

A coilina (COIL) foi identificada com 4 peptídeos nesta análise proteômica de cromatina espermática em suínos. Shanbhag et al. (2010) relataram que sua principal função é a de servir como um centro organizacional em corpos de cajal (suborganelles nucleares de 300-500 nm de diâmetro, que tipicamente ocorrem perto do gene cluster de histona e o nucléolo). Os mesmos autores descreveram que deleção de coilina em camundongos demonstra redução da fertilidade e falha no recrutamento de várias proteínas-chave para o corpo de cajal, incluindo snRNPs (pequenas ribonucleoproteínas nucleares) e a sobrevivência do complexo de proteínas de neurônios motores.

A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) encontrada nesta amostra com 3 peptídeos, desempenha funções de glicólise e participa de eventos nucleares, incluindo a transcrição, o transporte de RNA, a replicação do DNA e apoptose (Applequist et al., 1995). Tristan et al. (2011) demonstrou que a GAPDH nuclear translocada é ainda acetilada na Lys-160 pela histona acetiltransferase p300/CBP, por meio da interação direta da proteína, que por sua vez estimula a atividade catalítica de p300/CBP. Segundo os mesmos autores este evento nuclear leva à acetilação do supressor de tumor p53, e, por ambos os mecanismos, o complexo nuclear GAPDH-Siah (E3-ubiquitina-ligase) pode regular a expressão gênica modulando modificações de histonas, que resultam em disfunção e morte celular.

As proteínas de transição nuclear 2 (TNP-2) foram encontradas na amostra, na base de 2 peptídeos. De acordo com Steger et al. (1998) estas proteínas são responsáveis pela transição histona-protamina na conversão de cromatina nucleossomal à forma compacta. Estudo prévio com suínos não detectou proteínas de transição na cromatina espermática (Banerjee & Smallwood, 1998). Estas proteínas provavelmente são

resíduos do processo de substituição de histonas por protaminas durante a espermiogênese.

A família ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNPs) está envolvida em muitos processos biológicos, tais como sinalização celular, reparo do DNA, e regulação da expressão do gene e da proteína (Almeida et al., 2014). A hnRNPC apresentou 2 peptídeos na amostra, e foi previamente descrita em núcleos espermáticos humanos por De Mateo et al. (2011).

Estas proteínas parecem compactar grandes regiões de pré-RNA (Zarnack et al., 2013) e desempenhar um papel no “splicing” de RNA (Swanson et al., 1987). Em humanos dados quantitativos de iCLIP (individual-nucleotide resolution UV-crosslinking and immunoprecipitation) mostraram que a proteína de ligação a RNA-hnRNPC compete com o fator de “splicing” U2AF65 em muitos locais conhecidos e desconhecidos de “splicing”. A perda de hnRNPC conduz a formação de “Alu éxons” anteriormente suprimidos, o que pode alterar gravemente a função de transcrição. Experimentos em minigenes explicam mutações associadas a doenças (por exemplo a hiperfenilalaninemia) em elementos Alu que dificultam a ligação hnRNPC. Assim, impedindo a ligação de U2AF65 a elementos Alu, a hnRNPC desempenha um papel crítico como um grande genoma sentinela protegendo o transcriptoma (Zarnack et al., 2013).

A ribonucleoproteína nuclear heterogênea K (hnRNPK) também apresentou 2 peptídeos na amostra. Esta proteína carrega três homólogos K (KH), domínios que são responsáveis pela ligação de DNA-RNA, e um K-interativo (KI) que faz a interação proteína-proteína. HnRNPK é predominantemente localizada no núcleo, onde está envolvida em múltiplos passos de expressão gênica tais como a transcrição, splicing de RNA e tradução (Almeida et al., 2014).

A proteína ACIN1 apresentou 2 peptídeos, e se mostra importante na matriz nuclear. Sahara et al. (1999) utilizaram um sistema *in vitro* para identificar um novo fator nuclear, designado Acinus, que após a apoptose induz a condensação da cromatina por meio da clivagem por caspase-3 sem induzir a fragmentação do DNA. Os mesmos autores mostraram que imunodepleção da Acinus é essencial para a condensação da cromatina apoptótica *in vitro*.

Outra proteína identificada também com 2 peptídeos é a proteína centromérica V (CENP-V). Segundo Tadeu et al. (2008) a superexpressão de CENP-V leva a

hipercondensação de heterocromatina pericentromérica, e a sua depleção em células de cultura “HeLa” leva à expansão anormal da constrição primária de cromossomos mitóticos, perda de localização e desestabilização do complexo cromossômico passageiro.

A proteína CHTOP esteve presente na amostra com apenas 1 peptídeo. Esta é uma proteína associada à cromatina, é o alvo cromatínico da protamina 1 e está envolvida na regulação da transcrição. Ela contém uma região rica em glicina e arginina, que interage com o RNA ou DNA diretamente ou em combinação com outras proteínas de ligação a nucleotídeos (Takai et al., 2014).

A proteína matrin-3 (MATR3) foi identificada na amostra contendo 1 peptídeo. Matrin 3 é uma proteína de matriz nuclear altamente conservada, sendo uma fosfoproteína com vários locais de fosforilação de tirosina e serina/treonina-cinases. Sua estrutura primária prevê uma localização de sinal nuclear bipartido (NSL), dois domínios de ligação de DNA e dois sítios de reconhecimento de RNA. Esta proteína tem sido implicada na reparação do DNA, no processamento, transporte e estabilização de RNA (Osman & Loveren, 2014).

A proteína serina quinase testis-específica 6 (TSSK6) foi identificada na amostra de espermatozoides suínos contendo 1 peptídeo. Segundo Palermo et al. (2014) a condensação de DNA em células de mamíferos tem importantes implicações na biologia da infertilidade humana. Para sua proteção, o DNA espermático é empacotado muito densamente, devido a ação da serina-quinase testículo-específica 6 (TSSK6) antes de ser liberado. Esta descrição demonstra a importância desta proteína para a cromatina espermática em humanos, e pode-se inferir tal importância também em suínos.

As proteínas da família de citoesqueleto como as queratinas, tubulinas e actinas identificadas neste estudo também foram identificadas em núcleos espermáticos humanos por De Mateo et al. (2011). Os mesmos autores relataram que algumas moléculas do citoesqueleto foram descritas por participar na formação da cauda e do formato do núcleo dos espermatozoides. Especificamente, as tubulinas foram também detectadas na cabeça dos espermatozoides sugerindo um provável papel relacionado com a reação acrossômica. Citoqueratinas e actinas foram associadas à matriz nuclear espermática de cobaias.

Palermo et al. (2014) relataram que cerca de 16 a 20% do DNA permanece ligado a histona, e não simplesmente como o resultado de um processo incompleto de

remodelação fenotípica do espermatozoide. Estes mesmos autores ainda descreveram que estas regiões são essenciais para as etapas de pré-fertilização, desempenhando um papel específico durante a maturação de células germinativas masculinas; além disso, eles são as porções de cromatina espermática mais sensíveis a danos e são acessíveis para a maioria dos ensaios de fragmentação de DNA.

Esta pesquisa identificou diversas variantes de histona nos espermatozoides maduros e ejaculados. A este respeito, o transporte e a incorporação de histonas modificadas do espermatozoide para o zigoto tem sido demonstrados e indicam outro potencial efeito paterno na reprogramação epigenética do zigoto após a fertilização, que é independente do estado “imprinting” (Miller et al., 2010). As histonas foram apenas uma pequena parte das proteínas identificadas na amostra estudada de cromatina espermática, pressupondo que diversas outras proteínas podem transmitir informações epigenéticas ao zigoto.

De acordo com Miller et al. (2010) os controles epigenéticos de expressão gênica existem tanto para a ativação da metilação do DNA quanto para metilação, acetilação e fosforilação de histonas, e a entrada de histonas no ovócito deixa um espaço para o DNA e para os sinais epigenéticos baseados nas histonas, que podem ser importantes para o desenvolvimento embrionário subsequente. Os mesmos autores descreveram resultados decorrentes das análises da composição de domínios solúveis (ligados à histonas) e insolúveis (ligados à protaminas), em espermatozoides humanos e murinos, indicam que a cromatina é de fato o contribuinte mais significativo para um sinal epigenético nestas células.

Uma mudança de conceito que vem sendo estabelecida refere-se ao fato de que as histonas no núcleo espermático não se caracterizam necessariamente como um erro na compactação cromatínica. Existem regiões intercaladas entre as estruturas toroidais da cromatina espermática, contendo sequências de nucleossomos, que contém muitas das vezes DNA hipometilado. Tais regiões podem ser implicadas em importantes funções relacionadas ao desenvolvimento embrionário inicial e herança epigenética paterna (Beletti, 2013).

É possível que as proteínas da matriz nuclear envolvidas em diferentes marcações gênicas possam contribuir após a fecundação para estabelecer a ordem de reativação gênica paterna (Oliva, 2006), podendo já ser um indício de função epigenética proteica. Pode-se inferir, portanto, a partir dos resultados obtidos nesta

pesquisa e das funções das proteínas descritas, que a matriz nuclear, da qual fazem parte as proteínas cromatínicas, transmite ao ovócito mecanismos essenciais para seu crescimento e diferenciação. Assim, as proteínas passam a ser não só componentes estruturais da arquitetura cromatínica/matricial, mas sim componentes essenciais do sucesso da reprodução.

Nesta pesquisa 15,6% das proteínas foram classificadas como não caracterizadas, ou seja, não há relatos na literatura quanto à descrição, identificação e isolamento destas proteínas para qualquer espécie. Assim, novos estudos podem ser projetados na tentativa de caracterização destas proteínas e conhecimento de suas funções, a fim de esclarecer possíveis heranças paternas epigenéticas que fogem ao conhecimento científico atual. A comparação entre animais férteis e sub-férteis pode ser interessante na busca por variações proteômicas. Tais estudos podem aprimorar técnicas de reprodução e melhoramento animal de diversas espécies, com foco na escolha de reprodutores não só de alto potencial genético, mas também de alto potencial epigenético.

O conjunto de proteínas presentes na cromatina espermática de suínos demonstra que a matriz nuclear desempenha funções importantes na maturação e desenvolvimento das células espermáticas, e seria relevante determinar o quanto estas estruturas proteicas estão ligadas ao estabelecimento de funções epigenéticas, e como elas podem afetar o desenvolvimento embrionário.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o isolamento das proteínas da matriz nuclear de espermatozoides suíno foi satisfatório, demonstrando que o protocolo utilizado foi eficiente. Algumas famílias de proteínas foram identificadas e descritas. Contudo não foi possível identificar algumas estruturas proteicas, como a protamina 1.

Desta forma este estudo vem contribuir com um catálogo de estruturas proteicas que podem ser úteis em futuros estudos proteômicos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.O.; GARCIA, C.B.; MATOS-SILVA, F.A.; CURTI, C.; LEOPOLDINO, A.M. Accumulated SET protein up-regulates and interacts with hnRNPK, increasing its binding to nucleic acids, the Bcl-xS repression, and cellular proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v.445, p.196–202, 2014.

ANDRABI, S.M.H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal Assisted Reproduction Genetic**, Nova York, v. 24, p.561–569, 2007.

APPLEQUIST, S.E.; KEYNA, U.; CALVIN, M.R.; BECK-ENGESER, G.B.; RAMAN, C.; JÄCK, H.M. Sequence of the rabbit glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding Cdna, **Gene**, Amsterdam, v.163, p.325-326, 1995.

BANERJEE, S.; SMALLWOOD, A. Chromatin modification of imprinted H19 gene in mammalian spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.50, p. 474–84, 1998.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.92-96, 2013.

BITERGE, B.; SCHNEIDER, R. Histone variants: key players of chromatin. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 356, p.457–466, 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.

BULOW, M.V.; HEID, H.; HESS, H.; FRANKE, W.W. Molecular Nature of Calicin, a Major Basic Protein of the Mammalian Sperm Head Cytoskeleton. **Experimental Cell Research**, New York, v.219, n.2, p.407-413, 1995.

CHEN, M.; WANG,H.; LI, X.; LI, N.; XU, G.; MENG, Q. PLIN1 deficiency affects testicular gene expression at the meiotic stage in the first wave of spermatogenesis. **Gene**, Amsterdam, v.543, p.212-219, 2014.

CODRINGTON, A.M.; HALES, B.F.; ROBAIRE, B. Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. **Human Reproduction**, Chicago, v.22, n.5 pp. 1431–1442, 2007.

DE MATEO, S.; CASTILLO, J.; ESTANYOL, J.M.; BALLESCÁ, J.L.; OLIVA, R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. **Proteomics**, Weinheim, v.11, p.2714–2726, 2011.

D'ESPOSITO, M.; QUADERI, N.A.; CICCODICOLA, A.; BRUNI, P.; ESPOSITO, T.; D'URSO, M.; BROWN, S.D.M. Isolation, physical mapping, and Northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. **Mammalian Genome**, New York, v.7, p.533-535, 1996.

DHAWAN, L.; LIU, B.; PYTLAK, A.; KULSHRESTHA, S.; BLAXALL, B.C.;TAUBMAN, M. B. Y-Box Binding Protein 1 and RNase UK114 Mediate MonocyteChemoattractant Protein 1 mRNA Stability in Vascular Smooth Muscle Cells. **Molecular and Cellular Biology** , New York, v.32, n.18, p. 3768–3775, 2012.

D'OCCHIO, M.J.; HENGSTBERGER, K.J.; JOHNSTON, S.D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.101, p.1-17, 2007.

ENGEL, W.; KEIME, S.; KREMLING, H.; HAMEISTER, H.; SCHLUTER, G. The genes for protamine 1 and 2 (PRM1 and PRM2) and transition protein 2 (TNP2) are

closely linked in the mammalian genome. **Cytogenetics and cell genetics**, New York, v. 61, n.2, p. 158-69, 1992.

GALERAUD-DENIS, I.; LAMBARD, S.; CARREAU, S. Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v.9, p. 587–592, 2007.

GEYER, C.B.; INSELMAN, A.A.; SUNMAN, J.A.; BORNSTEIN, S.; HANDEL, M.A.; EDDY, E.M. A missense mutation in the Capza3 gene and disruption of F-actin organization in spermatids of repro32 infertile male mice. **Developmental Biology**, Orlando, v.330, p.142–152, 2009.

GRIMM, C.; CHARI, A.; PELZ, J.A.; KUPER, J.; KISKER, C.; DIEDERICH, K.; STARK, H.; SCHINDELIN, H.; FISCHER, U. Structural Basis of Assembly Chaperone-Mediated snRNP Formation. **Molecular Cell**, New York, v.49, p.692–703, 2013.

HLADY, R.A.; NOVAKOVA, S.; OPAVSKA, J.; KLINKEBIEL, D.; PETERS, S.L.; BIES, J.; HANNAH, J.; IQBAL, J.; ANDERSON, K.M.; SIEBLER, H.M.; SMITH, L.M.; GREINER, T.C.; BASTOLA, D.; JOSHI, S.; LOCKRIDGE, O.; SIMPSON, M.A.; FELSHER, D.W.; WAGNER, K.U.; CHAN, W.C.; CHRISTMAN, J.K.; OPAVSKY, R. Loss of Dnmt3b function upregulates the tumor modifier Mnt and accelerates mouse lymphomagenesis. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.122, p. 163-177, 2012.

LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; MARTIN, G.; LEVY, R. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.10, p. 535–541, 2004.

LEMOES, M.S. Caracterização morfológica e bioquímica do ânulo nuclear de espermatozoide bovino. 2013. 45f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MACLEOD, G.; TAYLOR, P.; MASTROPAOLO, L.; VARMUZA, S. Comparative phosphoproteomic analysis of the mouse testis reveals changes in phosphopeptide abundance in response to Ppp1cc deletion. **Eupa Open Proteomics**, Leuven, v.2, p. 1-16, 2014.

MAIER, W.M.; NUSSBAUM, G.; DOMENJOUR, L.; KLEMM, U.; ENGEL, W. The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.5, p.1249-1254, 1990.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, Cambridge, v.139, p. 287–301, 2010.

MORANDI-FILHO, R. Análise da estrutura e identificação de proteínas da cromatina nuclear espermática de bovinos. 2013. 42f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.12, n.4, p. 417-435, 2006.

OLIVA, R.; BALLESCÁ, J. L. Proteomics of the spermatozoon. **Balkan Journal of Medical Genetics**, Skopje, v.15, p.27-30, 2012.

OSMAN, A.M.; VAN LOVEREN, H. Matrin 3 co-immunoprecipitates with the heat shock proteins glucose-regulated protein 78 (GRP78), GRP75 and glutathione S-transferase p isoform 2 (GSTp2) in thymoma cells. **Biochimie**, Paris, v. 101, p. 208-214, 2014.

PALERMO, G.D.; NERI, Q.V.; COZZUBBO, T.; ROSENWAKS, Z. Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 102, n. 6, p. 1508-1517, 2014.

PIRHONEN, A.; LINNALA-KANKKUNEN, A.; MAENPAA, P.H. Identification of Phosphoserine Residues in Protamines from Mature Mammalian Spermatozoa1. **Biology of reproduction**, Madison, n.50, p. 981-986, 1994.

RAUCH, A. Computational Proteomics Analysis System (CPAS): an extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput biological experiments. **Journal of Proteome Research**, Boston, v.5, p.112-121, 2006.

SAHARA, S.; AOTO, M.; EGUCHI, Y.; IMAMOTO, N.; YONEDA, Y.; TSUJIMOTO, Y.. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. **Nature**, London, v.401, p. 168-173, 1999.

SHANBHAG, R.; KURABI, A.; KWAN, J. J.; DONALDSON, L.W. Solution structure of the carboxy-terminal Tudor domain from human Coilin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.584, p.4351–4356, 2010.

STEGE, K.; KLONISCH, T.; GAVENIS, K.; DRABENT, B.; DOENECKE D.; BERGMANN, M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.4, n.10, p.939-945, 1998.

SWANSON, M.S.; NAKAGAWA, T.Y.; LEVAN, K.; DREYFUSS, G. Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.7, p.1731-1739, 1987.

TADEU, A.M.B.; RIBEIRO, S.; JOHNSTON, J.; OLDBERG, I.; GERLOFF, D.; EARNSHAW, W.C. CENP-V is required for centromere organization, chromosome alignment and cytokinesis. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.27, p. 2510-2522, 2008.

TAKAI, H.; MASUDA, K.; SHIRAHIGE, K.; AKIYAMA, T. 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOPMethylosome Complex. **Cell Reports**, Cambridge, v. 9, p. 48–60, 2014.

TRISTAN, C.; SHAHANI, N.; SEDLAK, T.W.; SAWA, A. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, Oxford, v.23, p.317–323, 2011.

UNIPROT. Banco de dados de proteínas, 2015. Disponível em:<<http://www.uniprot.org>> Acesso em junho, 2015.

VAN KONINGSBRUGGEN, S.; STRAASHEIJM, K.R.; STERRENBURG, E.; GRAAF, N.; DAUWERSE, H.G.; FRANTS, R.R.; VAN DER MAAREL, S.M. FRG1P-mediated aggregation of proteins involved in pre-mRNA processing. **Chromosoma**, Basel, v.116, n.1, p. 53-64, 2007.

WRIGHTA, P. C.; NOIRELA, J.; OWA, S. Y.; FAZELIB, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, Milan, v.77, p.738-765, 2012.

ZARNACK, K.; KÖNIG, J.; TAJNIK, M.; MARTINCORENA, I.; EUSTERMANN, S.; STÉVANT, I.; REYES, A.; ANDERS, S.; LUSCOMBE, N.M.; ULE, J. Direct Competition between hnRNP C and U2AF65 Protects the Transcriptome from the Exonization of Alu Elements. **Cell**, New York, v.152, p. 453–466, 2013.

YAMAUCHI, Y.; SHAMAN, J.A.; WARD, W.S. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. **Asian Journal of Andrology**, Shangai, v.13, p. 31–35, 2011.

ZHONG, L.; BELOTE, J.M. The testis-specific proteasome subunit Pros_6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclearmaturation during spermatogenesis. **Development**, Cambridge, v.134, p. 3517-3525, 2007.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados, sugere-se que as proteínas da matriz nuclear espermática suína desempenham papéis essenciais nos processos reprodutivos em seus mais diferentes níveis. Essas proteínas podem estar relacionadas à maturação e diferenciação dos espermatozoides, assim como podem estar implicadas no desenvolvimento embrionário inicial. Assim sendo, a catalogação dessas proteínas é um importante primeiro passo para a descoberta de importantes informações epigenéticas paternas passadas ao zigoto.

Vale destacar que futuros estudos podem elucidar como e em qual estágio da maturação espermática essas proteínas se fizeram presentes na matriz nuclear, e qual a possível ação na expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário.