



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



**PROTEOMA NUCLEAR E MICRO-RNAS DE
ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E
SUBFÉRTEIS**

Ricardo Tomaz da Silva
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Março de 2018



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



**PROTEOMA NUCLEAR E MICRO-RNAS DE
ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E
SUBFÉRTEIS**

Ricardo Tomaz da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Março de 2018

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

S586p
2018 Silva, Ricardo Tomaz da, 1971
 Proteoma nuclear e micro-rnas de espermatozoides de bovinos
 férteis e subférteis / Ricardo Tomaz da Silva. - 2018.
 77 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.457>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Espermatozoides - Teses. 3. Reprodutores
(Gado) - Teses. 4. Espectrometria de massa - Teses. I. Beletti, Marcelo
Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**



Ata da defesa de **TESE DE DOUTORADO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: **TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/005/2018**

Data: 28/03/2018

Discente: **Ricardo Tomaz da Silva** – Matrícula – 11313VET029

Título da Tese: PROTEOMA NUCLEAR E MICRO-RNAS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS

Área de concentração: PRODUÇÃO ANIMAL

Linha de pesquisa: BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

Projeto de Pesquisa de vinculação: FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS QUE AFETAM A EFICIÊNCIA PRODUTIVA E REPRODUTIVA DE ANIMAIS DE INTERESSE ZOOTÉCNICO

Aos 28 dias do mês de Março do ano de 2018 às 09:00 horas na sala 2D54 – Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: José Octávio Jacomini – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; Belchiolina Beatriz Fonseca – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; João Antonio Zanardo – FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA; André Belico de Vasconcelos – UNIVERSIDADE DE UBERABA e Marcelo Emilio Beletti orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Marcelo Emilio Beletti concedeu a palavra ao/a candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) aprovado.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 12 horas e 30 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 28 de março de 2018.

Prof. Dr. José Octávio Jacomini
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof. Dr. João Antonio Zanardo
FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA

Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos
UNIVERSIDADE DE UBERABA

Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti

ORIENTADOR

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RICARDO TOMAZ DA SILVA – nascido aos 22 de setembro de 1971, na cidade de Maringá, estado do Paraná. Concluiu o curso de Medicina Veterinária em julho de 1998 pela Universidade Federal de Uberlândia, pela Universidade Federal de Lavras fez o curso de Especialização em Produção de Ruminantes, tendo concluído a referida especialização em 2005, foi aprovado e iniciou pela Universidade Federal de Uberlândia mestrado acadêmico pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, curso concluído em 2013. Trabalhou como Médico Veterinário autônomo na região de Uberlândia – Minas Gerais, nas áreas de produção e reprodução de bovinos de corte e leite no período compreendido entre 2000 e 2006. No ano de 2005 iniciou atividade como docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Presidente Antônio Carlos de Uberlândia. Em 2006, aprovado em concurso público, iniciou o exercício da atividade de Médico Veterinário na Prefeitura Municipal de Uberlândia, onde foi coordenador do Setor de Vigilância em Alimentos (2010 a 2014) e Coordenador da Vigilância Sanitária de Uberlândia (2014 a 2016). Iniciou em 2013, junto à Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, doutorado. Participou do Conselho de Alimentação Escolar de Uberlândia e em 2015 recebeu a Comenda Augusto César pela Câmara Municipal de Uberlândia - MG.

Epígrafe

“Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

Dedicatória

Agradeço a DEUS pelo dom da vida e pela família que me proporcionou.

Agradeço ao mestre Dr. Marcelo E. Beletti, por sua dedicação e por sua vocação, dedicando mais do que tempo a seus orientados.

Dedico este trabalho a meus pais, João Tomaz e Lueide. Ele, exemplo em tudo o que faz e sempre meu esteio, ela por seus ensinamentos, tudo o que representa e pela imensa saudade que deixou.

Beto e Carla, Tânia e André, Juninho e Juliana, Thiago, Isabela, Samuel, Raffael, Júlia, Rafaela e Vinicius pelo amor, apoio e confiança na longa caminhada.

Walter, Tânia, Cristiane, Marcelo, Lílian, Fabrício, Felipe, Ana Alícia e Ana Bárbara por acreditarem que seria possível e pelo apoio sempre.

Daniela e João Gabriel não sei o que seria sem vocês, repletos de amor, alegria e fé. Em cada ato demonstram a importância de sermos uma família “FELIZ!!!”. Amo-os intensamente, a cada segundo e por toda vida!!!

Dedico este trabalho a todos aqueles que em pensamentos ou ações tornaram este momento realidade!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - PROTEOMA NUCLEAR E MICRO-RNAS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS.....	07
RESUMO.....	07
SUMMARY.....	08
INTRODUÇÃO.....	09
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
 CAPÍTULO II - MICRO-RNAs (miRNAs) DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM ANÁLISE COMPARATIVA DE AMOSTRAS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS (<i>Bos taurus</i>) SUBFÉRTEIS E FÉRTEIS.....	19
ABSTRACT.....	19
INTRODUCTION.....	20
METHODS.....	21
RESULTS.....	24
DISCUSSION.....	26
CONCLUSIONS.....	28
REFERENCES.....	29
 CAPÍTULO III - PROTEOMA DO NÚCLEO DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS.....	33
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
 CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76

PROTEOMA NUCLEAR E MICRO-RNAS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS

RESUMO - A compreensão da composição e fisiologia do espermatozoide é importante para compreender a subfertilidade transitória ou permanente em touros. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar as proteínas nucleares e micro-RNAs de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis, na tentativa de se identificar marcadores moleculares de fertilidade e subfertilidade em touros. Para a avaliação de micro-RNAs foi utilizada a metodologia de RNA-seq e para as proteínas nucleares foi utilizada a espectrometria de massas avançada de amostras de sêmen de touros férteis e subférteis. Foram identificados 1306 micro-RNAs nas amostras de sêmen avaliadas. Identificou-se por análises computacionais os genes bta-miR-380-5p, bta-miR-155, bta-miR-122, bta-miR-30c e bta-miR-34a como sendo diferencialmente expressos em touros férteis e subférteis, indicando que estes podem configurar possíveis marcadores de fertilidade. No entanto, ficou claro que não existe um micro-RNA único que marque diferentes tipos e causas de subfertilidade. Quanto às proteínas nucleares, foi possível verificar que espermatozoides de touro possuem na constituição de sua cromatina protamina 1 e 2, assim como as variações de histona subH2Bv, H2A.J, H2A.2C, H4, H2B.1, H1.2, H2A.Z, H3.1, H3.3C, H3.3C-like, H1.3, H3.3, H3.2. Dentre proteínas nucleares, contaminantes de outros compartimentos do espermatozoide e do plasma seminal, identificou-se a proteína Acil-tioesterase 1 (APT-1), o fator beta de crescimento do nervo (Beta-NGF), a proteína do plasma seminal A3 (BSP-3), a Histona H2A.J, a proteína FAM71D, as proteínas ribossomais 40S-S8 e a 60S-L9, o inibidor de serina protease plasmática (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpin A5) e a subunidade alfa catalítica da proteína quinase dependente de cAMP como tendo potencial para serem utilizadas como marcadoras de fertilidade. Já a proteína ATPase do reticulo endoplasmático transicional, a subunidade 5 da NADH desidrogenase (ubiquinona) do subcomplexo 1 alfa, a proteína de choque térmico beta-9, as proteínas ribossomais 60S-L12 e 40S-S7 e a proteína acetiltransferase do acetil-CoA apresentaram potencial para serem utilizadas como marcadoras de subfertilidade.

Palavras-chave: RNA-seq, proteínas nucleares, cromatina, espectrometria de massa, touro, fertilidade

PROTEOME NUCLEAR AND MICRO-RNAS OF SPERM FROM FERTILE AND SUBFERTILE CATTLE

SUMMARY - Understanding the composition and physiology of spermatozoa is important to understand transient or permanent subfertility in bulls. Thus, the objective of this work was to evaluate the nuclear and micro-RNA spermatozoa of fertile and subfertile cattle, in an attempt to identify molecular markers of fertility and subfertility in bulls. For the evaluation of micro-RNAs the RNA-seq methodology was used and for nuclear proteins the advanced mass spectrometry of semen samples from fertile and subfertile bulls was used. A total of 1306 micro-RNAs were identified in the semen samples evaluated. The bta-miR-380-5p, bta-miR-155, bta-miR-122, bta-miR-30c and bta-miR-34a genes were identified by computational analysis as being differentially expressed in fertile and subfertile bulls, indicating that they can set up possible fertility markers. However, it was clear that there is no single micro-RNA that marks different types and causes of subfertility. As for the nuclear proteins, it was possible to verify that spermatozoa of bull have in the constitution of their protamine chromatin 1 and 2, as well as the histone variations subH2Bv, H2A.J, H2A.2C, H4, H2B.1, H1.2, H2A.Z, H3.1, H3.3C, H3.3C-like, H1.3, H3.3, H3.2. Among nuclear proteins and contaminants from other sperm and seminal plasma compartments, the acyl thioesterase 1 protein (APT-1), nerve growth factor beta (Beta-NGF), seminal plasma protein A3 (BSP-3), Histone H2A.J, FAM71D protein, 40S-S8 and 60S-L9 ribosomal proteins, the plasma serine protease inhibitor (Protein C inhibitor) (Serpin A5) and the catalytic alpha subunit of the cAMP-dependent protein kinase as having potential to be used as a fertility marker. On the other hand, the ATPase protein of the transitional endoplasmic reticulum, subunit 5 of NADH dehydrogenase (ubiquinone) of subcomplex 1 alpha, beta-9 heat shock protein, ribosomal proteins 60S-L12 and 40S-S7 and acetyl-CoA protein acetyltransferase presented potential to be used as subfertility markers.

Keywords: RNA-seq, nuclear proteins, chromatin, mass spectrometry, bull, fertility

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

As taxas de fertilidade são, na bovinocultura, afetados por falhas reprodutivas também associadas aos machos. As técnicas de avaliação do sêmen têm passado na última década por modificação nas metodologias utilizadas com o objetivo de aumentar a confiabilidade e identificar possíveis marcadores moleculares para que estes possam ser utilizados na melhoria das taxas reprodutivas e, consequentemente, nos índices financeiros. À medida que utilizamos mais intensamente as biotecnologias na reprodução animal, maior a tendência das falhas reprodutivas serem associadas a aumentos nos custos de produção e queda na rentabilidade da atividade pecuária.

Melhorias nas taxas reprodutivas e aumento nas taxas de prenhez são intimamente associados à qualidade do espermatozoide. Falhas no processo reprodutivo são também marcadas pela incapacidade de fertilização do ovócito por espermatozoides incompetentes morfológica ou fisiologicamente, consequentemente, é de se esperar que análises precisas, confiáveis e de alta repetibilidade possam contribuir na busca pela fertilidade associada à qualidade do sêmen bovino.

Espermatozoides são células transcripcionalmente inativas, entretanto altamente especializadas e compartmentalizadas com papéis metabólicos diferenciados em suas diferentes regiões (Rahman et al., 2013). Produzidos em um processo único chamado espermatogênese, que ocorre nos testículos e epidídimos marcado por alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (Kimmens & Sassone-Corsi, 2005).

A percepção de que espermatozoides morfológicamente normais podem apresentar-se subférteis ou inférteis, e que mesmo machos sabidamente férteis podem apresentar subfertilidade temporária sem causa aparente (Beletti e Mello, 1996) mostra que as rotinas de avaliação do sêmen devem ser associadas à composição nuclear espermática, incluindo cromatina e matriz, para aumentar a confiabilidade e melhorar o desempenho dos processos reprodutivos.

Beletti (2013) indica a necessidade da avaliação da cromatina espermática em função da possibilidade da identificação de alterações epigenéticas e fragmentação das cadeias de DNA. Assim, torna-se objetivo desta pesquisa, a utilização das biotécnicas proteoma e

transcriptoma, para a identificação e descrição de proteínas e reguladores da transcrição de proteínas que interfiram na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Espermatogênese

Estudos correntes citam que a espermatogênese é um processo regulado por 1.500 a 2.000 genes e que, qualquer alteração nestes genes pode causar distúrbios de fertilidade no macho (Razavi et al., 2017). O estudo proteômico busca o conhecimento dos genes, seus produtos e seu papel regulatório dentro das células (Baker, 2011).

Divisões mitóticas e meióticas de espermatogônias dão origem aos espermatozoides nos túbulos seminíferos, onde divisões mitóticas produzem a espermatogônia B, que ao entrar em meiose transforma-se em espermatócitos primários que se dividem (primeira divisão meiótica) e geram espermatócitos secundários, estes por sua vez sofrem nova divisão (segunda divisão meiótica) formando as espermátides que sofrerão mudanças estruturais em sua composição, inclusive na cromatina, formando o espermatozoide (Rahman, Kwon & Pang, 2017).

Cui, Sharma & Agarwal (2016) relatam que durante a maturação espermática as histonas são substituídas por protaminas, a cabeça é condensada e o citoplasma é progressivamente eliminado e a densidade cromatínica aumenta gradualmente até o final do processo, sendo que estas modificações levam a um espermatozoide mais apto à fecundação.

Proteoma

A identificação de 581 proteínas (cromatinicas e nucleares) em espermatozoides humanos (Castillo, Amaral & Oliva, 2014) e de 222 proteínas no núcleo de espermatozoide suíños (Mendonça et al. 2017) apresenta uma complexa e rica combinação de histonas, fatores de transcrição, proteínas associadas e modificadoras de cromatinas competentes para a condução de informação epigenética ao zigoto, contrariando a ideia de mera função de transmissão do genoma paterno na forma de um complexo de nucleoprotaminas altamente condensadas.

Comparando, por análise proteômica, proteínas presentes no capuz, corpo e cauda de espermatozoides de ratos, Skerget e colaboradores (2015) relatam mudanças substanciais durante o trânsito epididimário com 732 proteínas adquiridas e 1034 proteínas perdidas pelo espermatozoide neste processo, com provável interferência nos resultados finais do processo reprodutivo.

Gaviragli e colaboradores (2010) trabalhando com sêmen de touros Holstein demonstraram que os níveis de expressão de proteínas estão correlacionados à fertilidade (alta ou baixa) e que sua atividade celular relaciona-se à interação espermatozoide-ovócito e regulação do ciclo celular.

Cui, Sharma e Agarwal (2016) em estudo proteômico de espermatozoides de homens férteis perceberam comportamento específico neste tipo celular, com o número de proteínas diminuindo como nível de maturação dos gametas, aumentando aquelas envolvidas com motilidade, energia metabólica, fosforilação oxidativa e, decrescendo as envolvidas na biossíntese, transporte e ubiquitinação de proteínas, e com a resposta a processo oxidativo.

Assim como Peddinti e colaboradores (2008), que relatam comportamento semelhante em touros de alta e baixa fertilidade, onde apresentaram maior expressão as proteínas associadas ao metabolismo de energia, comunicação celular e motilidade.

Embora Lin e Tsai (2012) tenham descrito que a criopreservação de sêmen parece não gerar danos ao DNA de indivíduos férteis afirmam que existe probabilidade de o gameta masculino ser comprometido por processos de oxidação e, assim ter sua fertilidade comprometida. Importante ressaltar que autores como Westfalewicz, Dietrich & Ciereszko (2015) afirmam que a qualidade do sêmen é afetada pelo processamento, pois em estudo avaliando proteínas de sêmen bovino submetido ao congelamento relatam que 16 proteínas apresentaram mudanças significativas, e que a maioria decresceu com a criopreservação, entretanto, a maioria destas proteínas é extracelular.

Transcriptoma

Espermatozoides transportam informações genéticas a serem entregues ao ovócito durante a fecundação e, além do DNA também carreiam fatores transpcionais e componentes epigenéticos (Kropp et al., 2017).

Embora transpcionais inativos os espermatozoides são ricos em miRNAs ativos que são, reguladores epigenéticos (Rodgers et al., 2013), amplamente relacionados à reprodução animal (Fagerlind et al., 2015).

A utilização de miRNAs pode contribuir no entendimento da ação reguladora da expressão gênica esclarecendo como os espermatozoides expressam fertilidade atuando sobre o desenvolvimento embrionário inicial e o desenvolvimento fetal (Govindaraju et al., 2012) além de atribuir aos indivíduos diferentes graus de fertilidade.

Contendo de 19 a 25 nucleotídeos, os miRNAs são transcritos primários processados por uma enzima nuclear RNase II (Drosha) e, posteriormente transportados do núcleo para o citoplasma via Exportina5 e processado pela enzima Dicer (endoribonuclease da família RNase III). Uma vez clivados os miRNAs se ligam ao Complexo Silenciador Induzido por RNA (RISC) e, ativado o complexo, atua controlando a expressão dos RNAs (Dogan, Mason & Memili, 2014).

Os transcritos de RNAs podem ser utilizados como marcadores de fertilidade em virtude da identificação das características do sêmen em bovinos, como descrito por Feugang e colaboradores (2010) pesquisa realizada utilizando sêmen bovino, onde espermatozoides de touros de alta fertilidade apresentaram alta concentração de transcritos de membrana e proteínas extracelulares, enquanto aqueles de baixa fertilidade mostraram pequena quantidade para fatores transpcionais e translacionais, indicando a possibilidade de sua utilização como potenciais marcadores de fertilidade.

Capra e colaboradores (2017) comparando sêmen bovino de alta e baixa motilidade identificaram 83 miRNAs diferencialmente expressos nos dois tipos de sêmen, sendo 40 previamente identificados em outros trabalhos e o restante identificados pela primeira vez. Todos os 40 miRNAs conhecidos estavam de alguma maneira relacionados com apoptose. Os autores concluíram que a expressão diferente destes miRNAs sugere que nas amostras de baixa motilidade há alteração das funções celulares e aumento da apoptose das células germinativas durante a espermatogênese.

Em sêmen de touros (Selvaraju et al., 2017) foram identificados transcritos para 13.838 genes associados à diferentes estágios de espermatogênese, cinética espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário, mais abundantemente descritos em testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal. Entretanto, podem ocorrer mudanças durante o processamento do sêmen que afetariam a análise de fertilidade do material, conforme demonstrado pelos estudos de Bogle e colaboradores (2016) em análise de sêmen humano, que mostraram mudanças no proteoma em todas as fases do processo de criopreservação, as quais podem prejudicar a capacidade de fertilização do espermatozoide.

Comparando amostras de sêmen humano normozoospérmico férteis (grupo controle), normozoospérmico com problemas de fertilidade e astenozoospérmico Bansal e sua equipe

(2015) identificaram 2081 transcritos diferencialmente expressos entre os grupos. A análise desses transcritos mostrou que alguns foram mais abundantes no grupo normozoospermático, mas em menor quantidade no grupo astenozoospérmico em comparação com o grupo controle. Alguns transcritos foram específicos para o grupo normozoospérmico, enquanto outros eram específicos para o grupo astenozoospérmico. Uma série de transcrições diferencialmente expressas em espermatozoides foram relacionadas à reprodução ($n = 58$) e ao desenvolvimento embrionário ($n = 210$). Algumas dessas transcrições foram relacionadas a proteínas de choque térmico, genes específicos do testículo e genes do cromossomo Y. Algumas vias metabólicas estavam fortemente correlacionadas com baixos níveis de expressão de genes, tais como via de ligação a diacilglicerol, regulação da polimerização e despolimerização da actina, glicólise, atividade do fator de iniciação da tradução, proteínas nucleares importadoras, dentre outras. Enfim, os autores concluíram que os RNAs dos espermatozoides têm um forte potencial para serem utilizados como marcadores de fertilidade.

Fagerlind et al.(2015) estabelecendo padrões para sêmen bovino (Holstein) de moderada a alta fertilidade em função de taxa de não retorno ao cio (NRR) descreveram sete miRNAs (mir-502-5p, mir-1249, mir-320a, mir-34c-3p, mir- 19b-3p, mir-27a-5p e mir-148b-3p) diferencialmente expressos, com forte tendência de expressão em touros de moderada fertilidade, indicando que touros de moderada NRR regulam negativamente a expressão destes genes.

Em espermatozoides de humanos, Wenhao et al. (2015) através da expressão dos miRNAs HSP-40, HSP-70 e HSP-90, concluíram que estes podem exercer regulação sobre a vitalidade, motilidade, apoptose e mesmo capacitação espermática, o que interfere na viabilidade do gameta e em sua taxa de fertilidade. Outros relatos (Li, Dong e Zhou, 2016) descrevem ainda funcionalidades quanto à criopreservação, capacitação, fertilização e separação de gametas X e Y.

Objetivos

As informações apresentadas demonstram a possibilidade da utilização de proteoma e transcriptoma como preditores de fertilidade. Objetivou-se com este estudo identificar microRNAs e proteínas nucleares espermáticos diferentemente expressos em espermatozoides de bovinos férteis e subférteis, bem como a identificação de possíveis marcadores de fertilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, M. A. The 'omics revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian Journal of Andrology*, v.13, n.1, p.6–10, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2010.62>
- BANSAL, S. K., GUPTA, N., SANKHWAR, S. N., RAJENDER, S. Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis. *Plos One*, v.10, n.5, p.e0127007, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127007>
- BELETTI, M. E., MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Brazilian Journal of Genetics*, v.19, p 97-103, 1996.
- BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.92-96, 2013.
- BOGLE, O. A., KUMAR, K., ATTARDO-PARRINELLO, C., LEWIS, S. E., ESTANYOL, J. M., BALLESCÀ, J. L., OLIVA. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology*, v.5, n.1, p.10-22, 2017. <https://doi.org/10.1111/andr.12279>
- CAPRA, E., TURRI, F., LAZZARI, B., CREMONESI, P., GLIOZZI, T. M., FOJADELLI, I., STELLA, A., PIZZI, F. Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High- and Low-motile sperm populations. *BMC Genomics*, v.18, p.14, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3394-7>
- CASTILLO, J., AMARAL, A., OLIVA, R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. *Andrology*, v.2, n.3, p.26-38, 2014. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00170.x>
- CUI, Z., SHARMA, R., & AGARWAL, A. Proteomic analysis of mature and immature ejaculated spermatozoa from fertile men. *Asian Journal of Andrology*, v.18, n.5, p.735–746, 2016. <http://doi.org/10.4103/1008-682X.164924>
- ADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique*, v.61, n.1, p. 56-75, 2003. <https://doi.org/10.1002/jemt.10317>

DOGAN, S., MASON, M. C., MEMILI, E. (2014). In book: Spermatozoa: Biology, Motility and Function and Chromosomal Abnormalities, Edition: 1, Chapter: Epigenetic Mechanisms in Mammalian Male Germline, Publisher: Nova Science Publisher, Editors: Erickson T. Brenda, pp.1-14.

FAGERLIND, M., STÅLHAMMAR, H., OLSSON, B. AND KLINGA-LEVAN, K. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, p.587–594, 2015. <https://doi.org/10.1111/rda.12531>

FEUGANG, J. M., RODRIGUEZ-OSORIO, N., KAYA, A., WANG, H., PAGE, G., OSTERMEIER, G. C., TOPPER, E. K., MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, v.21, n.3, p.312-24, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.06.022>

GAVIRAGHI, A., DERIU, F., SOGGIU, A., GALLI, A., BONACINA, C., BONIZZI, L., RONCADA, P. Proteomics to investigate fertility in bulls. *Veterinary Research Communications*, v.34, n.1, p.332010. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9387-0>

GOVINDARAJU, A., UZUN, A., ROBERTSON, L., ATLI, M. O., KAYA, A., TOPPER, E., CRATE, E. A., PADBURY, J., PERKINS, A., MEMILI, E. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.10, p.82, 2012. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-82>

KIMMINS, S., SASSONE-CORSI, P. “Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells”. *Nature*, v.434, n.7033, p.583–589, 2005. <https://doi.org/10.1038/nature03368>

KROPP J, CARRILLO JA, NAMOUS H, DANIELS A, SALIH SM, SONG J, KHATIB H. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC Genomics*. v.18, n.1, p.280, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3673-y>

LI, C., WANG, D., ZHOU, X. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction Science*, v.173, p.1-7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.008>

LIN, C., TSAI, S. The effect of cryopreservation on DNA damage, gene expression and protein abundance in vertebrate. *Italian Journal of Animal Science*, v.11, n.1, p.21, 2012. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e21>

MENDONÇA, G. A., MORANDI FILHO, R., SOUZA, E. T., GAGGINI, T. S., SILVA-MENDONÇA, M. C. A., ANTUNES, R. C., BELETTI, M. E. Isolation and identification of proteins from swine sperm chromatin and nuclear matrix. *Animal Reproduction*, v.14, n.2, p.418-428, 2017. <http://doi.org/10.21451/1984-3143-AR816>

PEDDINTI, D., NANDURI, B., KAYA, A., FEUGANG, J. M., BURGESS, S. C., MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Systems Biology*, v.2, p.19, 2008. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-19>

RAHMAN, M. S., KWON, W. S., PANG, M. G. Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v.84, n.9, p.749-759, 2017. <https://doi.org/10.1002/mrd.22810>

RAHMAN, S., LEE, J.S., KWON, W.S., PANG, M.G. "Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception". *International Journal of Endocrinology*, v. 2013, Article ID 360986, pp.11, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/360986>

RAZAVI, S. M., SABBAGHIAN, M., JALILI, M., DIVSALAR, A., WOLKENHAUER, O., SALEHZADEH-YAZDI, A. Comprehensive functional enrichment analysis of male infertility. *Scientific Reports*, v.7, p.15778, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16005-0>

RODGERS, A. B., MORGAN, C. P., BRONSON, S. L., REVELLO, S., BALE, T. L. Paternal Stress Exposure Alters Sperm MicroRNA Content and Reprograms Offspring HPA Stress Axis Regulation. *Journal of Neuroscience*, v.33, n.21, p.9003-9012, 2013. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013>

SELVARAJU, S., PARTHIPAN, S., SOMASHEKAR, L., KOLTE, A. P., BINSILA, B. K., A. ARANGASAMY, A., RAVINDRA, J. P. Occurrence and functional significance of the transcriptome in bovine (*Bos taurus*) spermatozoa. *Scientific Reports*, v.7, p.42392, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42392>

SKERGET, S., ROSENOW, M. A., PETRITIS, K., & KARR, T. L. Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLoS ONE*, v.10, n.11, p.e0140650, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140650.s003>.

TANG W, LIU DF, KAI H, ZHAO LM, MAO JM, ZHUANG XJ, MA LL, HUI J. miRNA-mediated regulation of heat shock proteins in human ejaculated spermatozoa. Turkish Journal of Medical Sciences. v.45, n.6, p.1285-91, 2015.

WESTFALEWICZ B, DIETRICH MA, CIERESZKO A. Impact of cryopreservation on bull (*Bos taurus*) semen proteome. Journal of Animal Science, v.93, n.11, p.5240-53, 2015.
<https://doi.org/10.2527/jas.2015-9237>

CAPÍTULO 2

MICRO-RNAs (miRNAs) DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM ANÁLISE COMPARATIVA DE AMOSTRAS DE ESPERMATOZÓIDES DE TOUROS (*Bos taurus*) SUBFÉRTEIS E FÉRTEIS.

Artigo nas normas da Animal Reproduction

**MICRO-RNAs (miRNAs) DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN
COMPARATIVE ANALYSIS OF SPERM SAMPLES FROM
SUBFERTILE AND FERTILE BULLS (*Bos taurus*)**

Silva, R.T.¹, Gomes, M.S.², Fujimura, P.T.³, Beletti, M.E.¹

1. Graduate Program in Veterinary Science - Veterinary Medicine Course - Federal University of Uberlândia, Uberlândia / Minas Gerais.
2. Laboratory of Bioinformatics and Molecular Analysis of the Institute of Genetics and Biochemistry. Federal University of Uberlândia - Patos de Minas Campus (UFU).
3. Laboratory of Nanobiotechnology of the Institute of Genetics and Biochemistry. Federal University of Uberlândia.

ABSTRACT

Infertility or subfertility in bovine males may be related to spermatic microRNAs (miRNAs), whose function seems to be associated with the regulation of gene expression, degradation or storage of messenger RNAs (mRNAs) for later translation into early embryonic development. Semen samples from two bulls (*Bos taurus*) which were subfertile (T1 and T2) and one fertile (Tc) were used to perform the RNAseq technique for miRNAs. In sum, 1306 miRNAs were identified in the samples. The bta-miR-380-5p, bta-miR-155, bta-miR-122, bta-miR-30c and bta-miR-34a genes were identified by computational analysis as being differentially expressed between the groups, indicating that these genes may present themselves as possible fertility markers. However, it has become clear that there is no single miRNA that marks different types and causes of subfertility.

Keywords: RNAseq, fertility, gene regulation.

INTRODUCTION

Animal reproduction has benefited from research in the area of molecular biology, presenting the possibility of improving fertility indexes based on greater and more specific knowledge of the mechanism of action, identification and characterization of RNAs. Some of the doubts about the physiological mechanisms of infertility in males could be clarified by the identification and recognition of the functions of microRNAs (miRNAs) (Khazaie & Nasr Esfahani, 2014).

The miRNAs are transcribed from different genomic regions as long primary transcripts (pri-miRNA) by the action of RNA polymerase II. After transcription, they are processed by an RNase III (Drosha) and a double-stranded RNA binding protein (DGCR8 / Pasha), being transformed into pre-miRNAs. In turn, these are exported to the cytoplasm by Exportin 5-Ran-GTP (Costa & Pacheco, 2012). In the cytoplasm, the pre-miRNA is cleaved by the Dicer protein (ribonuclease), generating an intermediate double-stranded molecule. The RNA Induced Silencing Complex (RISC), a ribonucleic complex that controls the gene expression (Al-Gazi & Carroll, 2015), also found in the cytoplasm, breaks this double strand by incorporating one of the resulting strands into the cytoplasm complex, this RNA fragment being incorporated into the RISC, the mature miRNA. While the Dicer enzyme recognizes the miRNA in the pre-miRNA structure, Drosha acts to determine which part of the pre-miRNA will originate the mature miRNA (Costa & Pacheco, 2012).

Described as nucleotide groups whose length ranges from 18 to 23, miRNAs are found not only in animal or plant cells but also in viruses (Pfeffer et al., 2004; Washietl et al., 2012), and act on the mRNAs in the regulation of gene expression by translational repression, degradation or storage for later translation (Costa & Pacheco, 2012).

Small non-coding RNAs, miRNAs participate in the regulation of various physiological processes, apparently acting after fertilization (Nishimura & Dode, 2014) and

their discovery allowed a new insight into the mechanisms of gene regulation (Washietl et al., 2012). According to Ge et al. (2015), miRNA populations are critical for the development of germ cells in males, acting on postnatal spermatogenesis, and on spermatocytes and spermatids, showing their role in fertility.

Studies point out that miRNAs are tissue-specific and, as such, are involved in differentiation processes in specific cells (Dias Correia & Dias Correia, 2007). Studies such as those by Fagerlind and his collaborator (2015) have been emphatic in stating that bull sperm are rich in active miRNAs and that specific sperm miRNAs may be linked to fertility.

The determination of miRNA profiles has become relevant for the understanding of the regulation mechanisms of the different biological processes, including fertility in males, and that bulls with low fertility present larger populations of miRNAs when compared to those of high fertility (Rauber, 2013). The profiles of certain miRNAs may make them possible fertility markers (Miller & Ostermeier, 2006; Al-Gazi & Carroll, 2015).

The miRNAs are assigned a strict post-transcriptional and post-translational regulatory profile in several biological processes, acting in a significant way on reproductive processes such as embryogenesis, oogenesis and spermatogenesis (Ghorbian, 2012). Thus, the purpose of this study was to describe the profile of differentially expressed miRNAs in semen samples from subfertile bulls (*Bos taurus*) and to evaluate if they are likely to be used as fertility markers.

METHODS

Eight samples of 0.5 ml of frozen semen from a commercially proven fertility bull identified at Tc (Control Bull), and eight semen samples of 0.5 ml from each bull, from two subfertile bulls (samples T1 and T2). At the time of the acquisition of fertile bull semen, it was present in a commercial catalogue with information about its progeny and performance,

following the pattern used by several technicians for the multiplication of herds in commercial breeding herds (Summaries: National Association of Breeders and Researchers - "Associação Nacional dos Criadores e Pesquisadores – ANCP," and the Brazilian Association of Zebu Breeders – "Associação Brasileira dos Criadores de Zebú – ABCZ": 566 offspring, 37 herds under the supervision of these institutions).

To evaluate the fertility of the samples, approximately 50 PIVEs (In Vitro Embryo Production) were performed with the use of approximately 3,100 viable oocytes. The cleavage rate of PIVEs performed with semen from the subfertile bulls was 50.29% and that of the fertile bull was 70.13%. The blastocyst rate at day seven after fertilization was 14.88% for PIVEs using subfertile bull semen and 47.01% for the fertile bull, which shows the difference in reproductive efficiency between the two types of sample. To calculate the rate of blastocysts, only the number of cleaved embryos that came to blastocyst was considered.

Samples from each bull were submitted to RNA extraction protocols performed according to procedures described by mirVana™ miRNA Isolation Kit (AM1560) by Life (Life Technologies Corporation) (AM1560). Then, the amplification of the miRNAs was carried out, not to mention the preparation of the library (Ion Total RNA-Seq Kit v2), the PCR emulsion reaction, enrichment, as well as the injection of the sample on the chip by the Ion Chef equipment. The sequencing was done on Proton Ion equipment (Ion Proton™ System, Thermo Fisher Scientific Inc.).

The microRNA library (Ion Total RNA-Seq v2 kit) was prepared according to the protocol where the hybridization was performed with hybridization solution (3µL), Ion Adapter Mix V2 (2µL) and MicroRNA-3µL (1-100ng of miRNA), performed in two thermocycles (65°C - 10min and 16°C - 5min).

To perform the binding, the reaction was carried out at 16°C for 4 hours using binding buffer (10µL) and Mix binding enzyme (2µL), being added Reverse Transcriptase (H2O

nuclease free - 2 μ L, RT buffer 10X - 4 μ L, 2.5mM dNTP Mix - 2 μ L and Ion RT Primer V2 - 16 μ L), and the sample was incubated at 70°C for 10 min and then placed on ice, being added 4 μ L of SuperScript III Enzyme to the reaction, incubated at 42°C for 30 min.

The cDNA purification was performed with the Magnetic Bead Cleanup Module, for DNA amplification and Barcodes insertion. From each cDNA, 6 μ L were transferred to the new tube and Taq platinum PCR SuperMix High Fidelity (45 μ L) and Ion Xpress RNA 3 Barcode primer (1 μ L) (barcode 1-16) were added. In a thermocycler, the 2 cycles (94°C - 2min) and 14 cycles (94°C - 30s, 50°C - 30s, 68°C - 30s, 94°C - 30s, 62°C - 30s, 68°C - 30s and 68°C - 5min) were performed.

The reaction was purified with Magnetic Bead Cleanup Module, emulsion PCR and the enrichment reaction were carried out on the Chef Ion using the PI IC 200 Ion kit and the PI Ion chip for 16 hours, whereas sequencing was carried out on the Ion Proton using the Ion PI Sequencing 200.

The isolated miRNAs from each evaluated bull were sent to the bioinformatics analysis, so that those differentially expressed were identified in the animals evaluated. The comparison between the samples was established using two methodologies for searching for targets to increase the robustness of the analytical procedure: the *miRanda* program using as cutoff minimum free energy of the hybridization -20 kcal / mol, 100% of identity between nucleotides 2 and 8 of the miRNA and, the *RNAhybrid* program, using as cutoff minimum free energy of hybridization -20 kcal / mol. Both procedures were implemented in an offline Linux platform to perform the experiment in a *high-throughput* way. A 3 'Bos taurus UTR database was created using Biomart-Ensembl to perform target search for miRNAs identified as differentially expressed.

RESULTS

The miRNAs bta-miR-380-5p, bta-miR-155, bta-miR-34a, bta-miR-122 and bta-miR-30c, among 1306 identified, were the ones differentially expressed when comparing T1, T2 and Tc. There was greater expression of the miRNAs bta-miR-380-5p and bta-miR-155 in the (T1) sample and lower expression of the bi-miR-34a in the (T2) sample in the subfertile bulls when compared to the (Tc) control sample data presented in table 1. When comparing the subfertile bulls (T1 and T2), the miRNAs bta-miR-380-5p, bta-miR-155 and bta-miR-30c presented higher expression in the T1 sample, while the bta- miR-122 was not identified in the same sample (table 2). The bta-miR-122 was present in the control bull, but at an insufficient transcriptional level to be different from the absence in the T1 bull and insufficient to be different from the expression in the T2 bull.

Table 1. Expression of miRNAs in subfertile bulls (T1 and T2 samples) compared to fertile bull (Tc)

	T1 Sample		Tc Sample		Identification	
	Seq Sample	Seq (Normal)	Seq Sample	Seq (Normal)	miRNA	miRBase Mature Sequence
MIMAT 0003803	11472.00	6693.96	1.00	0.74	miR-380- 5p	Ugguugaccauagaacaugcgc
MIMAT 0009241	5478.00	3196.44	3.00	2.21	miR-155	Uuaaugcuaaucgugauaggggu
T2 SAMPLE		Tc SAMPLE				
T2 X Tc	Seq Sample	Seq (Normal)	Seq Sample	Seq (Normal)	miRNA	
MIMAT 0004340	217.00	126.86	3801.00	2800.63	miR-34a	Uggcagugucuuagcugguugu

Table 2. Expression of miRNAs between subfertile bulls (T1 and T2 samples)

	T1 Samples		T2 Samples		Identification	
	Seq Sample	Seq (Normal)	Seq Sample	Seq (Normal)	miRNA	miRBase Mature Sequence
T1 X T2						
MIMAT 0003803	11472.00	6693.96	154.00	90.03	miR-380-5p	ugguugaccauagaacaugcgc
MIMAT	5478.00	3196.44	29.00	16.95	miR-155	uuaaugcuaaucgugauaggggu

0009241						
MIMAT 0003849	0	0	183.00	106.98	miR-122	uggagugugacaauugguguug
MIMAT 0003850	137252.00	80087.11	4725.00	2762.17	miR-30c	uguaaacauccuacacucucagc

Thus, 37,273 and 701 targets were found for these five differentially expressed miRNAs with the RNAhybrid and miRanda computational programs, respectively. The different number of targets found is due to the specificity of each program. Only the targets found in both programs were accepted as true positives.

At the end, 503 targets were considered, being bta-miR-380-5p (17 targets), bta-miR-155 (15 targets), bta-miR-122 (83 targets), bta-miR-30c (31 targets) and bta-miR-34a (357 targets).

With a higher level of significance, the myomesin 3 targets for bta-miR-380-5p (e-value = 0.000766), de-etiolated homolog 1 (Arabidopsis) for bta-miR-155 (e value = 0.042995), Lysine demethylase 2a for bta-miR-122 (e-value = 0.000929), embryonic ectoderm development for bta-miR-30c (e-value = 0.00247) and phosphofuran acidic cluster sorting protein 1 for the bta -miR-34a (e-value = 0.000115) (Table 3).

Table 3. Targets of differentially expressed miRNAs, biological functions and actions

miRNA	e-value	Target	Description	Molecular Function	Biological Process
miR-380-5p	0.000766	Uncharacterized Protein	myomesin 3	unidentified	Not described
miR-155	0.042995	Uncharacterized Protein	de-etiolated homolog 1 (Arabidopsis)	unidentified	Not described
miR-122	0.000929	Uncharacterized Protein	lysine demethylase 2a	DNA binding zinc ion connection	Correction in the separation of the double strand via non-homologous histone H3-K36 dimethylation
miR-30c	0.00247	Polycomb EED Protein	embryonic ectoderm	Chromatin Regulator,	Transcription and regulation of

			development	Repressor	transcription
miR-34a	0.000115	Uncharacterized Protein	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	Connecting ion channel	Target Protein for the Golgi Complex Target Protein for the Plasma Membrane

DISCUSSION

The expression of miRNAs exhibits variations between fertile and subfertile animals. The miR-380-5p and miR-155 miRNAs were more expressed in the T1 sample whereas miR-34a was presented with a lower degree of expression in the T2 sample when compared to the control sample (fertile bull) (table 1). The observed result raises the hypothesis that there are differences in miRNA content between fertile and subfertile individuals, and even among subfertile individuals, since it was observed that the miRNAs identified were not the same in T1 and T2 samples. While the miRNAs bta-miR-380-5p, bta-miR-155 and bta-miR-30c showed higher expression in the T1 sample, bta-miR-122 was not even identified in the sample. This fact can be attributed to different causes of subfertility, since identical biological responses from different organisms cannot be expected, despite the same race and sex; other variables may have led to the observed difference.

Swarbrick et al. (2017) and Cimino-Reale et al. (2017) report that miR-380-5p has been found in studies related to tumor cells and embryonic cells, which store among themselves the intense multiplication capacity. Its great presence in T1 can justify the fact that the initial embryonic development (blastocyst formation) is also characterized by the intense cellular multiplication and, therefore, is affected by this miRNA.

The miR-155 is related to different tissues, high concentrations of this miRNA may reflect systemic damage and, as a result, affect fertility. They are also related to subfertility in males and with Follicle Stimulating Hormone (FSH) in a mechanism still unknown (Tsatsanis

et al. al., 2015). Faraonia et al. (2009) and Elton et al (2013) cite that miRNA-155 shows a varied expression profile and plays an important part in several biological processes. In inflammatory processes, its action seems to be associated with tissue damage "down-regulate," by protective action. Its elevated presence may be a marker of testicular tissue damage that may have occurred during spermatogenesis and could be the cause of changes in the spermatozoa leading to the subfertility of the T1.

Abundant in hepatic cells, according to Jopling (2012), miRNA-122 presents (Ghorbian, 2012) in azoospermia and idiopathic infertility in men. A correlation established by Hu et al. (2013) rises particular interest. On analyzing the expression of miRNA-122, it was found to be negatively regulated by treatment with 17 α -E2 while its levels decreased when treated with dexamethasone in the adrenal gland of rats. This observation allows the consideration of the role of miRNA-122 in inflammatory processes and also a role associated with reproduction, since 17 α -E2 has antiestrogenic action (Gonzalez-Freire, Dias-Ruiz & Cabo, 2017)

Evaluating various tissues of pigs, Lian et al. (2012) described high expression of miRNA-122 in the testicle, suggesting that it may play a variety of roles during testicular development or spermatogenesis, including its predominant late expression in male germ cells, degrading Transition Protein 2 (TNP2), a testis-specific regulator, which acts in the remodeling of chromatin during spermatogenesis. Its absence in the T1 suggests that it may be a marker of chromatinic alterations, which interfere in the initial development, justifying the low blastocyst formation rates in the PIVs performed with this semen,

Tumor suppressor in endometrial cancer (Kong et al., 2014) and also related by Coutinho et al. (2007) to breast cancer tumor cells, miRNA-30c has been described by Wijnen et al. (2014) and Noli et al. (2016) as a potential marker for implantation of blastocysts. This current research work demonstrates the presence of miRNA 30c in a smaller quantity in T2

when compared to T1. It is important to emphasize that the so-called proto-oncogenes, which are generally overexpressed in tumors, are of great importance in cell proliferation during embryonic development (Levinson, 2016), and it may be that this miRNA donated by the male gamete is a modulator of early embryonic development.

According to Zhao, Li & Chen (2010), miRNA 34a was associated with the induction of senescence in parental endothelial cells (EPC), mediators of angiogenesis, via inhibition of Sirt1, a protein that according to Tang (2016) plays a significant role in metabolic regulation and biogenesis of mitochondria, possibly activated under conditions of energy deficiency associated with diseases or injuries. Tscherner et al. (2014) describe the miRNA-34a present in both spermatozoa and oocytes and cleaved embryos. Although not yet certain as to its mechanism of action, this current study indicates that its lower expression may be associated with some types of subfertility, since in T2 there was an intense decrease of its expression.

CONCLUSIONS

There are differences in the content of miRNAs in fertile and subfertile bulls. However, it was not possible to identify a single miRNA that is differentially expressed in all sub-fertile bulls, probably because they are subfertility cases with different causes.

The miRNAs bta-miR-380-5p, bta-miR-155, bta-miR-122, bta-miR-30c and bta-miR-34a differentially expressed in this study require more specific studies for the determination of their mechanisms of action, but it is possible to consider them as possible markers not only of fertility in bulls, but also markers subfertility, such as testicular injury, fertilization process and embryonic development.

REFERENCES

- Al-Gazi MK, Carroll M.** 2015. Sperm-Specific MicroRNAs - Their Role and Function. *J Hum Genet Clin Embryol*, 1:003.
- Cimino-Reale G, Gandellini P, Santambrogio F, Recagni M, Zaffaroni N, Folini M.** 2017. miR-380-5p-mediated repression of TEP1 and TSPYL5 interferes with telomerase activity and favours the emergence of an “ALT-like” phenotype in diffuse malignant peritoneal mesothelioma cells. *J Hematol Oncol*, 10:140. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0510-3>.
- Costa EBO, Pacheco C.** 2012. Micro-RNAs: Perspectivas atuais da regulação da expressão gênica em eucariotos. *Biosci&ide*, 14(2): 81-93.
- Coutinho LL, Matukumalli LK, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Gasbarre LC, Capuco AV, Smith TP.** 2007. Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. *Physiol Genomics*, 29:35-43. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00081.2006>
- Dadoune, JP.** 2009. Spermatozoal RNAs: What About Their Functions? *Microsc. Res. Tech*, 72:536–551. <https://doi.org/10.1002/jemt.20697>
- Dias Correia, JHR, Dias Correia, AA.** 2007. Funcionalidades dos RNA não codificantes (ncRNA) e pequenos RNA reguladores, nos mamíferos. REDVET. *Rev Electrón Vet*, 8(10):1695-7504.
- Elton TS, Selement H, Elton SM, Parinandi NL.** 2013. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*, 532 (1) 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.009>
- Fagerlind M, Stalhammar H, Olsson,B and Klinga-Levan, K.** 2015. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. *Reprod Domest Anim*, 50(4):587-94. <https://doi.org/10.1111/rda.12531>
- Faraonia I, Antonetti FR, Cardonea J, Bonmassar E.** 2009. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol Basis Dis*. 1792 (6) 497-505. <https://doi.org/10.1016/j.bbadiis.2009.02.013>

- Ge SQ, Zhao ZH, Cui TZ, Gao ZQ.** 2015. Small Non-Coding RNAs in Mammalian Male Germ Cells and Their Implications for Male Infertility. *Andrology*, 4:150.
- Ghorbian S.** 2012. Micro-RNAs, next-generation molecular markers in male infertility field. *Transl Androl Urol*, 1(4):245-246. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2012.11.01>
- Gonzalez-Freire M, Diaz-Ruiz A, de Cabo R.** 2017. 17 α -Estradiol: A Novel Therapeutic Intervention to Target Age-related Chronic Inflammation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 72(1), 1–2. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw041>
- Jopling, C.** 2012. “Liver-Specific microRNA-122: Biogenesis and Function.” *RNA Biol*, 9(2):137–142. <https://doi.org/10.4161/rna.18827>
- Kong X, Xu X, Yan Y, Guo F, Li J, Hu Y, Zhou H, Xun Q.** (2014). Estrogen Regulates the Tumour Suppressor MiRNA-30c and Its Target Gene, MTA-1, in Endometrial Cancer. *PLoS ONE*, 9(3): e90810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090810>
- Levinson W.** 2016. Vírus Tumorais. In: Microbiologia médica e imunologia. 13 ed. Porto Alegre. AMGH Editora Ltda. pp 348-358.
- Lian C, Niu S, Yang R, Sun B, Qin L, Bai W, Shen B, Liu B, Zhang L and Zhao Z.** 2011. Expression Profiling of miRNA-122 and miRNA-221 in Porcine Various Tissues and Developing Testes. *J Anim Vet Adv*, 10: 3380-3384. <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2011.3380.3384>
- Liu X, Li M, Peng Y, Hu X, Xu J, Zhu S, Yu Z, Han S.** miR-30c regulates proliferation, apoptosis and differentiation via the Shh signaling pathway in P19 cells. *Exp Mol Med*. Nature Publishing Group. 2016. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.57>
- Lucio AC, Alves BG, Alves KA, Martins MC, Braga LS, Miglio L, Alves BG, Silva TH, Jacomini JO, Beletti ME.** 2016. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. *Theriogenology*, 86 (2016) 924–933. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>
- Miller D, Ostermeier GC.** 2006. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*, Vol.12, No.6 pp. 757–767. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml037>

Nishimura RC, Dode, MAN. 2014. RNAs de espermatozoide: qual a sua função fisiológica? *Rev Bras Reprod Anim*, 38(1):32-36.

Noli L, Capalbo A, Dajani Y, Cimadomo D, Bvumbe J, Rienzi L, Ubaldi FM, Ogilvie C, Khalaf Y, and Ilic D. Human Embryos Created by Embryo Splitting Secrete Significantly Lower Levels of miRNA-30c. 2016. *Stem Cells Dev*, 25(24):1853-1862. <http://doi.org/10.1089/scd.2016.0212>

Papaionnou MD, Nef S. 2010. MicroRNAs in the Testis: Building Up Male Fertility. *J Androl*; 31:26 – 33. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008128>

Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. 2004. Identification of virus encoded microRNAs. *Science*. 304:734-736. <https://doi.org/10.1126/science.1096781>

Rauber, LP. 2013. RNA espermático, uma visão holística. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 37(4):309-317.

Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, Balakrishnan A, Phua Y, Nguyen A, Chanthery Y, Lim L, Ashton LJ, Judson RL, Huskey N, R Blelloch R, Haber M, Norris MD, Lengyel P, Hackett CS, Preiss T, Chetcuti A, Sullivan CS, Marcusson EG, Weiss W, N 'Etoile L, Goga A. 2010. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN amplified neuroblastoma. *Nat Med.*, 16(10):1134-1140. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2227>

Tang BL. 2016. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol. Cell.*, 39(2):87-95. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2318>

Tsatsanis C, Bobjer J, Rastkhani H, Dermitzaki E, KatrinakiM, Margioris AN, Giwercman YL, Giwercman A. 2015. Serum miR-155 as a potential biomarker of male fertility. *Hum Reprod.*, 30(4):853-60. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev031>

Tscherner A, Gilchrist G, Smith N, Blondin P, Gillis D, LaMarre J. 2014. MicroRNA-34 family expression in bovine gametes and preimplantation embryos. *Reprod Biol Endocrinol*, 12:85. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-85>

Wijnen WJ, Made IVD, Oever SVD, Hiller M, De Boer BA, Picavet DI, Chatzispyrou IA, Houtkooper RH, Tijsen AJ, Hagoort J, van Veen H, Everts V, Ruijter JM, Pinto

YM, Creemers et EE. 2014. Cardiomyocyte-Specific miRNA-30c Over-Expression Causes Dilated Cardiomyopathy. *PLoS ONE*, 9(5):e96290.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096290>

Will S, Hendrix DA, Goff LA, Rinn JL, Berger B, Kellis M. 2012. Computational analysis of noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 3(6):759-78.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1134>

Zhao T, Li J, Chen AF. 2010. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent, information regulator 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(1), E110-E116. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00192.2010>

CAPÍTULO 3

PROTEOMA DO NÚCLEO DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS

Artigo nas normas da Revista Journal of Proteomics

PROTEOMA DO NÚCLEO DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINOS FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS

Ricardo Tomaz da Silva – Médico Veterinário, Doutorando em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). E-mail: ricardovet@hotmail.com

Amanda Nonato – Pós-Doutoranda pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). E-mail: amandanonato@zootecnista.com.br

Romualdo Morandi Filho – Farmacêutico, Biomédico, Doutorando em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Muller Carrara Martins – Mestrando em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). E-mail: mullercarrara@hotmail.com

Pollyanne Giovanna De Moraes Cunha – Graduanda do curso de Biotecnologia pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). E-mail: pollyannec.moraes@hotmail.com

Lucas Melo Gonçalves – Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). E-mail: lucasmelo3942@hotmail.com

Marcelo Emílio Beletti – Médico Veterinário, Professor Titular da Área de Morfologia (Histologia) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. E-Mail: mebeletti@ufu.br

RESUMO

A compreensão da composição e fisiologia do espermatozoide é importante para compreender a subfertilidade transitória ou permanente em touros. Objetivou-se com este trabalho avaliar as proteínas nucleares de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis, na tentativa de se identificar marcadores moleculares de fertilidade e subfertilidade em touros e melhor compreender o efeito da composição proteica do espermatozoide no processo de fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial. Cabeças de espermatozoide de amostras de sêmen de quatro touros, sendo dois férteis e dois subférteis, foram utilizadas para identificação e quantificação das proteínas do núcleo espermático por espectrometria de massas avançada. Essas amostras também foram utilizadas em rotinas de produção in vitro de embriões (PIVEs), obtendo-se a taxa de clivagem e de formação de blastocistos de cada amostra. Foi possível verificar que espermatozoides de touro possuem na constituição de sua

cromatina protamina 1 e 2, assim como as variações de histona subH2Bv, H2A.J, H2A.2C, H4, H2B.1, H1.2, H2A.Z, H3.1, H3.3C, H3.3C-like, H1.3, H3.3, H3.2. Dentre as proteínas nucleares e contaminantes de outros compartimentos do espermatozoide e do plasma seminal, foram identificadas 20 proteínas possíveis marcadores de fertilidade em touros, 18 que possíveis marcadores de subfertilidade, cinco proteínas que favoreceram e cinco que desfavoreceram o processo de fertilização e, 14 proteínas que favoreceram e seis que desfavoreceram o desenvolvimento embrionário inicial. Destacaram-se a proteína Acil-tioesterase 1 (APT-1), o fator beta de crescimento do nervo (Beta-NGF), a proteína do plasma seminal A3 (BSP-3), a Histona H2A.J, a proteína FAM71D, as proteínas ribossomais 40S-S8 e a 60S-L9, o inibidor de serina protease plasmática (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpina A5) e a subunidade alfa catalítica da proteína quinase dependente de cAMP como tendo potencial para serem utilizadas como marcadoras de fertilidade. Já a proteína ATPase do retículo endoplasmático transicional, a subunidade 5 da NADH desidrogenase (ubiquinona) do subcomplexo 1 alfa, a proteína de choque térmico beta-9, as proteínas ribossomais 60S-L12 e 40S-S7 e a proteína acetiltransferase do acetil-CoA possuem potencial para serem utilizadas como marcadoras de subfertilidade.

Palavras Chave: RNA-seq, proteínas nucleares, cromatina, espectrometria de massa, touro, fertilidade

INTRODUÇÃO

A espermatogênese trata-se de um processo especializado de diferenciação de uma célula haploide, a espermátides, a uma célula altamente especializada com a função de entregar ao ovócito o genoma paterno, o espermatozoide [1], que no testículo é uma célula

inerte e imóvel, e à medida que caminha pelo trato reprodutivo torna-se fisiologicamente ativo, adquirindo a capacidade de fecundação, por ação de diversos processos bioquímicos regulados por inúmeras proteínas com papéis expressivos, entretanto, por mecanismos ainda incompreendidos [2].

Espermatozoides são caracterizados como células altamente diferenciadas e compartmentalizadas, incapazes de sintetizar proteínas. Ainda assim, acredita-se na capacidade das proteínas em interferir no metabolismo celular do zigoto e exercer papel regulatório, por meio de proteínas presentes na matriz espermática, do desenvolvimento embrionário inicial.

Proteínas são descritas [3] como executores de funções fisiológicas e direcionadores das manifestações relativas à vida, e o estudo de suas estruturas e funções podem explicar mecanismos fisiológicos ou alterações patológicas. Assim as técnicas de análise proteômica [4] têm ajudado a compreender as funções e disfunções do espermatozoide estudando seus efeitos fisiológicos ou patológicos na reprodução.

O estudo proteômico busca a caracterização dos produtos gênicos e sua ação regulatória celular [5] uma vez que não mais se discute se, mas sim, quais proteínas são produzidas por mitocôndrias espermáticas e como serão utilizadas.

Pesquisas têm permitido caracterização mais detalhada do sêmen, levando em consideração a correlação entre os elementos constituintes do espermatozoide com os processos bioquímicos que envolvem a fertilização, clivagem e o desenvolvimento embrionário inicial.

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas, na reprodução animal, no intuito de correlacionar características morfométricas à fertilidade de machos em idade reprodutiva, entretanto, os métodos até então utilizados têm deixado lacunas ao tentar explicar falhas reprodutivas em animais com características espermáticas morfológicas normais.

Parte das dúvidas quanto aos mecanismos fisiológicos da subfertilidade ou mesmo infertilidade, em machos, podem ser esclarecidas por proteínas associadas à interação entre espermatozoide e ovócito ou à regulação do ciclo celular [7]. O espermatozoide bovino contém transcritos para 13.833 genes, associados a vários estágios de espermatozogênese, função espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário [8].

Autores [9] afirmam em seus estudos que à comparação do perfil de proteínas de espermatozoides em diferentes estágios de maturação de diferentes espécies animais revelam, por vezes, diferentes conjuntos de proteínas. Algumas proteínas podem exercer diferentes papéis no organismo e exercer funções específicas nos espermatozoides [10]. Durante a maturação dos espermatozoides [11] observou-se, em homens férteis, que as proteínas envolvidas na geração de gametas, motilidade celular, metabolismo energético e processos de fosforilação oxidativa mostraram níveis de expressão crescentes e aquelas envolvidas na biossíntese, transporte, ubiquitinação e resposta aos processos de estresse oxidativo mostraram redução de seus níveis de expressão e, ainda que o número de proteínas decresce de acordo com o nível de maturação dos espermatozoides.

Em estudo proteômico de espermatozoide bovino [12] foram identificadas 419 proteínas sendo 67% associadas à membrana celular. Enquanto, ao trabalhar com espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade [13], 3569 e 3799 proteínas foram identificadas nos respectivos grupos, sendo 1518 comuns aos grupos em estudos. Já [14] avaliando composição proteica de espermatozoides de pacientes humanos com quadros de astenozoospermia identificaram 17 proteínas com expressão proteômica distintas dos doadores controle, das quais 10 são descritas em maior expressão e 7 em menor expressão.

O estudo de espermatozoides de garanhões identificou 1030 proteínas, classificadas de acordo com o processo biológico, associadas ao metabolismo espermático, defesa, e receptores de atividade e antigênicos [15]. Enquanto, ao avaliar a Taxa Estimada de

Concepção Relativa (Estimated Relative Conception Rate - ECR) [16] através de amostras de sêmen de 16 touros, identificaram as proteínas α -enolase e o isocitrato deidrogenase subunidade alfa (α -IDH) como potenciais marcadores para alta e baixa fertilidade, associando-as ao metabolismo dos gametas masculinos.

É clara a necessidade do estudo mais aprofundado das proteínas presentes no núcleo espermático para que possamos esclarecer quais proteínas ali se encontram presentes e como atuam na fertilização, viabilidade do embrião e desenvolvimento embrionário inicial. Objetivou-se com este estudo identificar proteínas presentes no núcleo espermático de touros férteis e subférteis e discutir como as proteínas diferencialmente expressas nestes animais estão correlacionadas à fertilidade do macho bovino e ainda, discutir a possível utilização destas como marcadores de fertilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sêmen congeladas de quatro touros azebuados, sendo dois considerados férteis (touros 1 e 2) e dois subférteis (touros 3 e 4). O grau de fertilidade dos animais em análise foi estabelecido a partir de resultados de produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Produção *in vitro* de embriões

Foram realizadas 13 rotinas de produção *in vitro* de embriões segundo protocolo do laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia [17], sendo utilizados 419 ovócitos em PIVEs para os touros férteis (204 para o touro 1 e 215 para o touro 2) e 336 em PIVEs para os touros subférteis (155 para o touro 3 e 181 para o touro 4).

Como forma de neutralizar parcialmente os efeitos das variáveis não controláveis na PIVE, os dados obtidos utilizando sêmen testado foram normalizados tendo como referência os resultados obtidos com um touro fértil, previamente testado em nossos laboratórios e com resultados bastante estáveis.

Em todas as placas onde foram realizadas as rotinas de PIVE utilizando as amostras de sêmen avaliadas quanto à proteômica nuclear, também foram realizadas PIVEs utilizando sêmen deste touro referência (510 ovócitos). Para a normalização, as taxas de clivagem e de blastocistos das amostras testadas foram transformadas em porcentagem das taxas obtidas com o sêmen do touro referência, na mesma rotina de PIVE.

Apenas ovócitos classificados como grau 1 e 2 foram utilizados, sendo estes coletados de ovários de vacas azebuadas obtidos em frigorífico.

A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a fertilização in vitro e a taxa de blastocistos foi determinada no sétimo dia após a fertilização. A taxa de blastocistos foi calculada a partir do número de estruturas que iniciaram a clivagem e chegaram a blastocistos morfológicamente normais de acordo com a “International Embryo Transfer Society” [18].

Isolamento das cabeças dos espermatozoides

Amostras de sêmen a serem avaliadas foram descongeladas a 37°C por 3 minutos, em seguida acondicionadas em tubos de fundo cônico de 15ml contendo, 8ml de tampão 50mM de Tris-HCl 7,5 pH e 1mM de EDTA. Procedeu-se a centrifugação das amostras a 750 x G por 15 minutos à 4°C e remoção do sobrenadante. O pellet foi ressuspandido em 8ml do mesmo tampão e novamente realizados centrifugação e descarte do sobrenadante, sendo repetido este procedimento por 3 vezes.

Após a terceira centrifugação a amostra foi ressuspandida em 1,5ml da solução tampão, o material foi sonicado em gelo por 20 minutos com pulsos de 30 segundos e

intervalos de 5 segundos, em seguida centrifugado a 1000 x G por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 2,0 ml de tampão 50mM Tris-HCl e sacarose 1,1 M, pH 7,5.

A separação de cabeças e caudas dos espermatozoides foi realizada segundo os procedimentos descritos [19]. A metodologia se deu por ultracentrifugação, onde a amostra foi submetida a 75.600 x G por 45 minutos a 4°C; em um gradiente de 2ml de cloreto de césio (CsCl) a 2,82M, 25mM de Tris-EDTA, 5mM de MgCl_2 e 0,5% triton X-100) em tubo de 12ml para ultracentrífuga, sobreposto por 4ml de sacarose 2,2M e recoberto por 2ml de amostra em tampão 50mM Tris-HCl e sacarose 1,1 M, pH 7,5.

Após a ultracentrifugação foi, cuidadosamente, retirado o sobrenadante (pipetagem) contendo caudas e o sedimento ressuspêndido com tampão Tris 25mM, lavado 3 (três) vezes por centrifugação a 1000 x G por 30 minutos a 4 °C em tampão Tris 25mM para a retirada do excesso de Cloreto de Césio. Neste momento o pellet era composto basicamente por cabeças de espermatozoides isoladas, contudo, ainda existia pequena contaminação por fragmentos de cauda.

Extração da Cromatina e Matriz Nuclear

Para a extração da cromatina foi adotado o protocolo modificada [20], onde a amostra contendo cabeças isoladas foi ressuspêndida em 500 μL de solução contendo 1% de Triton X-100, 50mM tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA e 5 μL de coquetel inibidor de proteases, e agitadas em Vortex por 20 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 3 (três) vezes por centrifugação a 1100 x G por 30 minutos com 1,5ml de 50mM Tris-HCl, ph 7,5. O material foi ressuspêndido, após a última lavagem, em 500 μL de tampão de descondensação (40mM 1,4-ditiotreitol (DTT), 0,25M $(\text{NH}_4)_2\text{S}_4$, 25mM Tris-Hcl, pH 7,5, e 5 μL de coquetel inibidor de protease), permanecendo por 40 minutos em temperatura ambiente. Em seguida

foi adicionado 4000U de desoxirribonuclease I livre de RNase e homogeneizado por 60 minutos sob Vortex em temperatura ambiente. A amostra foi precipitada, evaporada em estufa à 43°C *overnight*.

Identificação das Proteínas.

Inicialmente, as amostras precipitadas foram ressuspendidas em 100µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8.8 contendo ureia 8M. Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford [21] 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 duplicatas em microplacas. A absorbância em 595nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Através dos dados obtidos na quantificação, foi estimada a massa total de proteínas presentes nas amostras.

Processamento das Amostras

A preparação das amostras 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. Foram utilizados 38 µL da amostra (50 µg).

Em resumo, as amostras foram submetidas à redução das pontes de dissulfeto das proteínas pela adição de DTT (ditiotreitol) na proporção 1mg DTT/mg proteína e incubação por 2 horas em temperatura ambiente seguida da alquilação pela adição de I.A. (iodoacetamida) na proporção 3 mg I.A./mg proteína e incubação por 1 hora em temperatura ambiente, no escuro.

O volume das amostras 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. As amostras foram então incubadas com 1 µg de tripsina (Promega, V511A, Lote 30551310) à 37°C “overnight”. Previamente a aplicação das amostras no espectrômetro de massas foi realizado o “clean-up”/ desalting das amostras, 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%. As amostras foram em seguida secas em *speed vac* e aplicadas em espectrômetro de massas, conforme descrito a seguir.

Análise por espectrometria de massas avançada

As amostras foram analisadas 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” [22].

Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade 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 específicos de bovinos. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. O número de peptídeos observados por proteína foi utilizado como indicativo aproximado de abundância.

Análise estatística

Para obter um número representativo da quantidade de cada proteína em cada amostra, foi realizada uma normalização das análises, transformando-se o número de peptídeo de cada

proteína em porcentagem do número total de peptídeo encontrado na amostra. Assim, utilizando-se o teste t de student para amostras pareadas, foi possível identificar as proteínas encontradas com diferentes quantidades em touros férteis e subférteis. Foram consideradas diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

Já para identificar possíveis influências da quantidade de cada proteína identificada sobre os processos de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* foi calculada a correlação entre essa porcentagem e a taxa de clivagem e de blastocistos obtidos nas PIVs, respectivamente. Foram consideradas correlações significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

As taxas brutas e normalizadas de clivagem e de blastocistos obtidas nas PIVES utilizando touros férteis e subférteis estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1. Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas nas PIVES de touros férteis e subférteis

Touros	Taxa de clivagem (%)		Taxa de blastocisto (%)	
	Valor bruto	Valor normalizado	Valor bruto	Valor normalizado
Férteis	53,2 ^a	98,69	50,2 ^a	93,32 ^a
Subférteis	35,1 ^b	62,43	3,4 ^b	6,57 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$)

Na análise por espectrometria de massas foram identificadas 766 diferentes proteínas, sendo 452 encontradas em pelo menos dois touros, 300 proteínas encontradas apenas em amostras de um animal e destas, 267 proteínas foram encontradas apenas em uma amostra (replica).

As seis proteínas mais abundantes eram provavelmente contaminantes, ou do meio de diluição (albumina), ou utilizadas no processamento das amostras (DNase 1, quimiotripsina)

ou de componentes da cauda (proteína 2 da fibra densa da cauda do espermatozoide, tubulina beta 2C e fosfolipídeo hidroperóxido glutationa peroxidase mitocondrial).

A variante subacrossomal da histona H2B (subH2Bv) foi a proteína nuclear mais abundantemente encontrada. Também foram encontradas em menor quantidade outras variantes de histonas, citadas a seguir, em ordem quantitativa decrescente: H2A.J, H2A.2C, H4, H2B.1, H1.2, H2A.Z, H3.1, H3.3C, H3.3C-like, H1.3, H3.3, H3.2. As histonas totalizaram 5,71% do total de peptídeos identificados.

Foram encontradas, no sêmen de todos animais em estudo protaminas 1 e 2, sendo que a protamina 1 foi em média 30% mais abundante.

Pelo menos 15 proteínas encontradas já foram previamente identificadas na cauda do espermatozoide. Outras 132 proteínas encontradas estão ligadas à estrutura das mitocôndrias ou ao metabolismo mitocondrial e 263 proteínas identificadas no presente trabalho já foram encontradas no meio extracelular.

Das proteínas encontradas, 20 não apresentaram qualquer tipo de informação quanto sua função nas bases de dados consultadas e, destas, 8 nunca foram encontradas.

Finalmente, 289 proteínas encontradas já foram caracterizadas como nucleares.

As proteínas identificadas em quantidades significativamente diferentes nos dois grupos (touros férteis e subférteis) estão demonstradas na tabela 2 e 3.

Tabela 2. Proteínas encontradas em maior quantidade em touros férteis

Proteína	Férteis * (%)	Subférteis* (%)	p
Histone H2B subacrosomal variant (SubH2Bv)	2,29	1,78	0,049
Outer dense fiber protein 1	2,99	1,09	0,050
Histone H2A.J (H2a/j)	1,37	0,91	0,0091
Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin VIB)	0,86	0,17	0,0065
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PP-1G)	0,51	0,34	0,0039

Protein FAM71D	0,66	0,0	0,0034
40S ribosomal protein S8	0,32	0,21	0,015
Proteasome subunit alpha type-6	0,31	0,22	0,041
Keratin, type II cytoskeletal 59 kDa, component IV	0,20	0,045	0,014
Keratin, type II cytoskeletal 71	0,20	0,00	0,00075
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform	0,066	0,039	0,021
Seminal plasma protein A3 (BSP-A3)	0,075	0,020	0,043
Malate dehydrogenase, mitochondrial	0,069	0,020	0,037
Acyl-protein thioesterase 1 (APT-1)	0,072	0,020	0,011
60S ribosomal protein L9	0,051	0,031	0,00098
Plasma serine protease inhibitor (Protein C inhibitor)	0,059	0,020	0,00090
Cilia- and flagella-associated protein 20	0,065	0,0081	0,022
Beta-nerve growth factor (Beta-NGF)	0,052	0,0086	0,015
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	0,039	0,011	0,0087
Secretoglobin family 1D member (LppAB)	0,015	0,00	0,046

* porcentagem de peptídeos da proteína em relação ao número total de peptídeos encontrados na amostra

Tabela 3. Proteínas encontradas em maior quantidade em touros subférteis

Proteína	Férteis* (%)	Subférteis* (%)	p
Serum albumin (BSA)	5,79	8,93	0,0078
Tubulin beta-2B chain	0,00	1,15	0,00010
Heat shock protein beta-9 (HspB9)	0,39	0,50	0,035
Ferritin light chain (Ferritin L subunit)	0,24	0,44	0,00018
Adiponectin (30 kDa adipocyte complement-related protein)	0,010	0,17	0,038
Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase)	0,097	0,15	0,040
60S ribosomal protein L8	0,069	0,15	0,0078
60S ribosomal protein L30	0,067	0,090	0,00091
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	0,016	0,053	0,024
60S ribosomal protein L12	0,023	0,047	0,0020

60 kDa heat shock protein, mitochondrial		0,011	0,054	0,0011
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5		0,015	0,043	0,020
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial		0,012	0,046	0,0078
ATP synthase subunit delta, mitochondrial		0,00	0,027	0,00016
Double-strand-break repair protein rad21 homolog		0,0035	0,019	0,019
Stress-70 protein, mitochondrial		0,0035	0,019	0,019
40S ribosomal protein S7		0,0036	0,016	0,016
Tetraspanin-8 (Tspan-8)		0,0035	0,016	0,014

* porcentagem de peptídeos da proteína em relação ao número total de peptídeos encontrados na amostra

As proteínas que tiveram correlações significativas positivas e negativas com as taxas de clivagem obtidas nas PIVEs são mostradas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

As proteínas que tiveram correlações significativas positivas e negativas com as taxas de blastocisto obtidas nas PIVEs são mostradas nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 4. Proteínas com correlação significativa ($p \leq 0,05$) positiva com a taxa de clivagem nas PIVEs

Proteína	Coeficiente de correlação	P
Acyl-protein thioesterase 1 (APT-1)	0,95	0,048
Calicin	0,97	0,029
Lingual antimicrobial peptide	0,98	0,015
Seminal plasma protein A3 (BSP-A3)	0,99	0,014
Beta-nerve growth factor (Beta-NGF)	0,99	0,015

Tabela 5. Proteínas com correlação significativa ($p \leq 0,05$) negativa com a taxa de clivagem nas PIVEs

Proteína	Coeficiente de correlação	P
Prohibitin-2	- 0,98	0,017
Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase)	- 0,99	0,0025

Cytochrome c oxidase subunit 2 (Cytochrome c oxidase polypeptide II)	- 0,99	0,0092
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 (Complex I subunit B13)	- 0,99	0,0036
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	- 0,99	0,0037

Tabela 6. Proteínas com correlação significativa ($p \leq 0,05$) positiva com a taxa de blastocistos nas PIVEs

Proteína	Correlação	p-valor
Histone H2A.J (H2a/j)	0,95	0,049
Coiled-coil domain-containing protein 63	0,96	0,042
Acyl-protein thioesterase 1 (APT-1)	0,97	0,030
40S ribosomal protein S8	0,98	0,016
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PKA C-alpha)	0,98	0,028
T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma) (CCT-gamma)	0,98	0,017
Protein FAM71D	0,99	0,0091
60S ribosomal protein L9	0,99	0,0079
Plasma serine protease inhibitor (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpin A5)	0,99	0,011
Signal peptidase complex subunit 3	0,99	0,013
Serine racemase	0,99	0,0066
Spermatogenesis-associated protein 6	0,99	0,0021
Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	0,95	0,045
Beta-nerve growth factor (Beta-NGF)	0,96	0,043

Tabela 7. Proteínas com correlação significativa ($p \leq 0,05$) negativa com a taxa de blastocistos nas PIVEs

Proteína	Correlação	p-valor
Heat shock protein beta-9 (HspB9)	- 0,96	0,040
Acetyl-CoA acetyltransferase	- 0,96	0,037
Limbín	- 0,96	0,045
60S ribosomal protein L12	- 0,97	0,035

DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2	- 0,97	0,035
Activated CDC42 kinase 1 (ACK-1)	- 0,97	0,035
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2 (Mitochondrial nucleoid factor 1)	- 0,97	0,035
40S ribosomal protein S7	- 0,98	0,015

DISCUSSÃO

Os resultados das PIVEs demonstraram claramente a diferença na fertilidade dos touros que compunham os dois grupos, férteis e subférteis. Esta caracterização é importante para que os resultados da proteômica dos dois grupos de touro sejam comparados.

A metodologia utilizada visou estudar as proteínas do núcleo do espermatozoide, mas, apesar de já ter sido utilizada em outros trabalhos [19,20], não foi eficiente no isolamento destas proteínas.

Foram identificadas diversas proteínas como prováveis contaminantes de outros compartimentos do espermatozoide e mesmo proteínas do plasma ou diluente seminal. Da mesma forma, como esperado, também foram encontradas proteínas utilizadas na preparação das amostras, tal como a DNase I e a quimiotripsina.

Das 766 proteínas encontradas, apenas 289 foram, em outros estudos, caracterizadas como nucleares. Contudo, não se pode descartar que outras proteínas encontradas possam ter sido extraídas do núcleo, pois não se conhece a localização de pelo menos 20 delas. Mesmo aquelas que já tenham sido descritas em outros compartimentos celulares, podem também estar presentes no núcleo do espermatozoide bovino. Estudos futuros são necessários para esclarecer estes achados.

É interessante salientar que foram encontradas protamina 1 e 2, na proporção de 1,3:1, não sendo diferente entre os dois grupos. Acreditava-se que espermatozoides de touros possuíssem apenas protamina 1 [24, 25, 26]. O presente trabalho demonstra que existe quantidade considerável desta proteína em espermatozoides de touro.

No entanto, a proporção encontrada entre protamina 1 e 2 pode não ser confiável, visto que as protaminas são proteínas básicas altamente ricas em lisina e arginina, e a quimiotripsina utilizada na preparação das amostras cliva cadeias peptídicas principalmente no lado carboxílico dos aminoácidos lisina ou arginina, resultando em fragmentos de peptídeo muito pequenos para serem detectados com as condições utilizadas na 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 [27, 28].

A identificação de grande quantidade de variáveis de histonas, tanto em touros férteis como subférteis, confirma que a presença de histonas após a finalização do processo de compactação da cromatina espermática é normal, ou até mesmo, necessária [29]. No presente estudo as histonas totalizaram 5,71% das proteínas identificadas. Em um estudo [27] com espermatozoides humanos elas totalizaram 9,7% e com espermatozoides de suínos [28] totalizaram 2,6%.

Como se torna impossível avaliar cada uma das proteínas em um único artigo, foi dada ênfase às proteínas que se apresentaram em quantidade significativamente diferente entre os dois grupos de animais ou àquelas que possuíssem correlação significativa com as taxas de clivagem e de blastocistos obtidas nas PIVEs.

Das proteínas encontradas em maior quantidade nos touros férteis, temos a variante subacrossomal da histona H2B, a qual participaria da montagem do acrossoma e do acoplamento acrossomático-nuclear [31]. Da mesma forma a histona H2A.J foi mais

abundante em touros férteis, no entanto, não se sabe exatamente a função desta histona. Teoricamente a maior quantidade destas proteínas seria um possível marcador de fertilidade.

A proteína Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PP1G) atua na espermogenese bloqueando a apoptose, e também na conformação estrutural (flagelos) do espermatozoide induzindo-o a uma fertilidade normal [32].

A proteína FAM71D é expressa nos testículos, e está correlacionada à motilidade progressiva do espermatozoide, apresentando baixa concentração em indivíduos com astenozoospermia, podendo interagir com a calmodulina, importante proteína na indução da motilidade flagelar [33]. Da mesma forma a proteína “Cilia- and flagella-associated protein 2” é uma proteína de cauda. Portanto, essas três proteínas estão relacionadas à motilidade do espermatozoide e provavelmente sejam contaminantes de outros compartimentos, que não o núcleo.

Assim como no presente trabalho, as proteínas ribossomais também foram encontradas nos núcleos de espermatozoides de suíno [28] e de humanos [27]. No presente trabalho, algumas dessas proteínas foram encontradas em maior quantidade em espermatozoides de touros férteis (40S ribosomal protein S8 e 60S ribosomal protein L9) e outras em espermatozoides de touros subférteis (60S ribosomal protein L8, L12 e L30 e 40S ribosomal protein S7).

A proteína “Proteasome subunit alpha type-6” compõe a subunidade proteassomal, a qual é 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, à regulação da transcrição, transdução de sinal, e determinação do “destino” da célula [34, 27]. Essa proteína foi encontrada em maior quantidade nos espermatozoides de touros férteis. Já a proteína “Malate dehydrogenase”, é tipicamente mitocondrial e também foi encontrada em

maior quantidade em touros férteis e deve ser um contaminante da peça intermediária da cauda do espermatozoide.

A proteína “Serine/threonine-protein phosphatase 2A” está relacionada com as modificações que os espermatozoides sofrem na passagem pelo epidídimo [35] e, portanto, a menor quantidade desta proteína poderia levar a problemas na maturação epididimária.

A proteína “Seminal plasma protein A3” é uma proteína secretada pelas glândulas anexas ao aparelho reprodutor masculino e, portanto, um contaminante, e não seria um marcador de fertilidade.

A proteína “Acyl-protein thioesterase 1 (APT-1)” está associada à diferenciação, ativação, resposta imune, proliferação e migração celular [36] e responsável pela depalmitoilização, auxilia a regulação da concentração de óxido nítrico (NO) na corrente sanguínea e sua ação sobre o epitélio vascular [37]. Não se sabe a exata função e localização no espermatozoide, mas aparentemente tem relação com a fertilidade.

“Plasma serine protease inhibitor” (Protein C inhibitor) é uma proteína altamente expressa no trato reprodutivo do macho e atua em diversos níveis tal como em alterações durante o trânsito no epidídimo. Sua ausência pode ser suficiente para causar infertilidade masculina. Interfere ainda na ligação entre espermatozoide-ovócito e fertilização *in vitro* [38].

Apesar de não ser uma proteína nuclear, pode ser interessante como marcador de fertilidade.

“Beta-nerve growth factor” (Beta-NGF) está presente no plasma seminal da maioria dos mamíferos domésticos e têm ação em machos e fêmeas. Nas fêmeas age sobre o corpo lúteo tornando-os maiores, com maior produção de progesterona, e melhorando as taxas de prenhez [39], no macho participa da regulação da diferenciação dos espermatócitos bloqueando espermatócitos secundários na metáfase II. A “cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha” (PKA C-alpha) é um regulador da motilidade espermática. Sua ativação promove o incremento na frequência de batimentos flagelares durante a capacitação [40].

Ambas também seriam contaminantes do plasma seminal e de membrana respectivamente, e não componentes nucleares.

“Secretoglobin family 1D member” (LppAB) é uma proteína componente do plasma seminal, neste trabalho encontrada em maior quantidade em touros férteis, a qual já teve observada correlação positiva com porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais [41] e, apesar de não ser uma proteína nuclear, possui potencial para ser utilizada como marcador de fertilidade.

Dentre as proteínas encontradas em maior quantidade em touros subférteis, as duas mais abundantes, “Serum albumin e Tubulin beta-2B chain” são prováveis contaminantes do plasma seminal e da cauda do espermatozoide, apesar de já terem sido encontradas em outros trabalhos de proteoma de núcleos de espermatozoides [27, 28].

Heat shock protein beta-9 (HspB9) é uma proteína testículo-específica que aumenta sua expressão com a idade mantendo sua concentração após a maturidade sexual. Em bodes se expressou mais intensamente durante o período de acasalamento e estação quente do ano, aparentemente regulando o metabolismo testicular quando em estresse térmico [42]. Portanto, essa proteína pode estar em maior quantidade nos touros subférteis como resíduo de uma provável e frequente causa de subfertilidade transitória de touros em clima tropical, o estresse térmico. Assim, esta proteína teria um grande potencial como marcador de subfertilidade causadas por estresse térmico.

A proteína “Ferritin light chain” é anormalmente expressa em fetos oriundos de FIV e ICSI, aumentando o risco de defeitos congênitos na reprodução assistida em [43]. Portanto, sua expressão parece ser deletéria para um bom desenvolvimento embrionário.

A Adiponectina é um regulador pleiotrópico de inúmeras funções biológicas, incluindo a esteroidogênese gonadal. Além do seu papel na esteroidogênese e na capacitação de espermatozoides a adiponectina pode estar envolvida na fusão e fertilização do ovócito, e

pode desempenhar um papel nas estruturas e funções do espermatozoide. Ao contrário do encontrado no presente trabalho, em experimento com touros da raça holandesa [44] foi encontrada maior concentração de adiponectina em touros altamente férteis quando comparados a touros de média e baixa fertilidade. Portanto, há a necessidade de novos trabalhos para esclarecer a relação entre adiponectina no sêmen e a fertilidade de touros.

A “Transitional endoplasmic reticulum ATPase” (TER ATPase ou VCP) é uma enzima envolvida com a degradação das mitocôndrias espermáticas após a fecundação do ovócito [45]. A maior quantidade em espermatozoides de touros subférteis poderia antecipar esta degradação e interferir no bom funcionamento dos espermatozoides.

O “cytochrome c oxidase subunit 5A”, a “60 kDa heat shock protein”, o “NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 5”, a acetyl-CoA acetyltransferase”, a “ATP synthase subunit delta” e a “Stress-70 protein” são componentes mitocondriais e por consequencia contaminantes da peça intermediária da cauda do espermatozoide. Por motivo desconhecido essa contaminação foi maior nos animais subférteis. É interessante salientar que a “60 kDa heat shock protein” e a “Stress-70 protein” são proteínas de estresse, possíveis marcadores de uma das principais causas de subfertilidade transitória de touros em clima tropical, o estresse térmico.

A proteína “double-strand-break repair protein rad21 homolog” é um importante fator para uma meiose perfeita [46]. A maior presença de proteínas necessárias nas etapas iniciais da espermatogênese, como neste caso, pode ser um indicador de células espermáticas imaturas. Assim, essa proteína tem potencial como marcadora de células espermáticas imaturas, típicas em sêmen de touros subférteis.

A Tetraspanina-8 é uma proteína até hoje não relacionada com espermatozoides, geralmente está relacionada com a capacidade metastática de tumores [47]. Já outras tetraspaninas são relacionadas com o processo de interação espermatozoide-ovócitos, sendo

que geralmente são encontradas na membrana dos ovócitos [48], porém também encontradas na membrana supra-acrossomal nos espermatozoides [49]. Como no presente trabalho ela foi encontrada em maior quantidade em touros subférteis, é provável que sua função esteja mais relacionada com o que já se conhece da tetraspanina-8 em células tumorais.

Com o objetivo de se identificar possíveis influências das proteínas identificadas com o processo de fertilização e com o desenvolvimento embrionário, foram avaliadas as correlações entre as taxas de clivagem e de blastocisto e a quantidade de cada proteína encontrada nas amostras.

A taxa de clivagem estaria diretamente, mas não de forma absoluta, relacionada com a fertilização do ovócito. Esta relação não é absoluta, pois existem ovócitos não fertilizados que iniciam a clivagem. Já a taxa de blastocistos (porcentagem de ovócitos que iniciam a clivagem e chegam a blastocistos normais) é obviamente dependente do desenvolvimento embrionário. Mas, também de forma não absoluta, pois os poucos ovócitos que iniciariam a clivagem sem a fecundação, também não chegariam a blastocisto.

Algumas proteínas mostraram correlação positiva com a taxa de clivagem e, portanto, favorecem o processo de fecundação, sendo elas:

- “Acyl-protein thioesterase 1” (APT-1) proteína associada à diferenciação, ativação, resposta imune, proliferação e migração celular [36] e responsável pela depalmitoilização, auxilia a regulação da concentração de óxido nítrico (NO) na corrente sanguínea e atua sobre o epitélio vascular.
- “Calicin” trata-se de um dos principais constituintes da teca perinuclear (camada rígida que cerca o núcleo do espermatozoide) pós-acrossomal, o cálice [50];
- “Lingual antimicrobial peptide” descrita em células epiteliais de ductos e alvéolos do tecido mamário, expressas em tecidos que apresentavam franca evidência de sinais inflamatórios [51];

- “Seminal plasma protein A3” (BSP-A3) é secretada pelas glândulas sexuais acessórias que revestem o espermatozoide no ejaculado de bovinos, permite maior tempo de motilidade dos espermatozoides armazenados no oviduto, exercendo papel fundamental na fertilização [52];
- “Beta-nerve growth fator” (Beta-NGF) presente no plasma seminal da maioria dos mamíferos domésticos tem ação em machos e fêmeas. Nas fêmeas age sobre o corpo lúteo tornando-os maiores e com maior produção de progesterona melhorando as taxas de prenhez [39], no macho participa da regulação da diferenciação dos espermatócitos bloqueando espermatócitos secundários na metáfase II.

Essas proteínas que apresentaram correlação positiva com a fecundação apresentam similaridades à medida que conferem proteção e resistência ao espermatozoide a partir do ejaculado (Calicin) revestindo o núcleo espermático ou lhe conferindo maior adaptabilidade quando no trato reprodutivo feminino (BSP-A3).

A viabilidade do gameta é mantida também por mecanismos ainda não esclarecidos, mas enquanto a presença do Beta-NGF relaciona-se com a probabilidade de seleção de células, ainda primordiais, mais capacitadas a fecundação, a Lingual Antimicrobial Peptide traz a possibilidade de mecanismos presentes em células associadas a processos inflamatórios apresentarem sinalizações semelhantes e com a mesma necessidade de proteção, uma vez que o ambiente uterino apresenta enorme desafio à viabilidade do espermatozoide até o momento da fecundação e os vários processos metabólicos desencadeados a partir deste momento, que podem ser sinalizados e harmonizados pela APT-1.

As proteínas que apresentaram correlação positiva com a taxa de blastocisto e, portanto, favorecem o desenvolvimento embrionário inicial foram:

- Histone H2A.J (H2a/j) pouco estudada, encontradas somente em mamíferos e relevante atuação como sinalizadores de genes inflamatórios associados a senescência

tecidual. Baixas concentrações inibem a expressão de genes inflamatórios que induzem a senescência e quando em alta expressão sinalizam o processo ao sistema imune [53];

- Coiled-coil domain-containing protein 63 (CCDC63) componente estrutural da cauda espermática confere ao gameta masculino a capacidade de se deslocar sistematicamente em direção ao ovócito [54];
- Acyl-protein thioesterase 1 (APT-1) proteína necessária no ciclo de palmitoilação, de fundamental importância para o trânsito de proteínas pela membrana celular e sinalização de processos biológicos [55];
- 40S ribosomal protein S8 atua reprimindo a translação de seu próprio mRNA pela inibição da unidade de iniciação ribossômica, promove a regulação da síntese proteica e acúmulo de proteínas ribossomais [56];
- A cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PKA C-alpha) regulador da motilidade espermática, sua ativação promove o incremento na frequência de batimentos flagelares durante a capacitação [40];
- T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1 γ) (CCT-gamma) presente na superfície de espermatozoides é descrito como um dos responsáveis pela ligação deste à zona pelúcida [57] e funciona como uma chaperona citosólico na biogênese da tubulina [58];
- Protein FAM71D expressa exclusivamente nos testículos, correlacionada à motilidade progressiva do espermatozoide, apresenta baixa concentração em indivíduos com astenozoospermia, pode interagir com a calmodulina [33];
- 60S ribosomal protein L9 (RPL9) reduz mudanças na conformação, erros de codificação e desvios no mecanismo de translação [59];

- Plasma serine protease inhibitor (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpin A5) altamente expressa no trato reprodutivo do macho atua em diversos níveis, alterações durante a fase de espermatozogênese podem ser suficientes para causar infertilidade masculina, interfere ainda na ligação entre espermatozoide-ovócito e fertilização *in vitro* [38];
- Signal peptidase complex subunit 3 (SPCS3) sinalizadores de proteína peptidase é essencial para a viabilidade celular, diretamente relacionada à clivagem de peptídeos sinalizadores sua ação está relacionada aos processos proteolíticos [60];
- Serine racemase (SRR) apresenta clara caracterização, intensa multigenicidade e ação incluindo coagulação sanguínea, ativação plaquetária, fibrinólise, trombose, ativadores de plasminogênio (PAs), proteína C ativa e as calicreínas [61];
- Spermatogenesis-associated protein 6 (SPATA6) é uma proteína testículo específico, codifica proteínas que promovem a ligação entre a cauda e a cabeça do espermatozoide ao final da espermatozogênese, sua inativação leva à produção de espermatozoides acéfalos e à infertilidade do macho, cita-se ainda sua relação com a miosina-base [62];
- Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha única enzima mitocondrial capaz de produzir ATP por fosforilação na ausência de oxigênio [63];
- Beta-nerve growth factor (Beta-NGF) estimula a motilidade espermática e facilita reações do acrosoma, interfere na proliferação e diferenciação das células de Leydig e produção de testosterona [64].

A maioria dessas proteínas deveria ter relação com a fecundação e não com o desenvolvimento embrionário, mas além das funções já descritas podem também estar relacionadas a funções pós-fecundação, já que a maioria delas penetra totalmente no ovócito neste processo.

Existe também a possibilidade de elas não atuarem diretamente no desenvolvimento embrionário, mas estarem acompanhando outros problemas não identificados pela metodologia utilizada neste trabalho e que interfeririam no desenvolvimento embrionário, ou seja, seriam marcadores indiretos.

A continuidade do processo de diferenciação celular por que passa o embrião traz a necessidade de avaliar até quando as proteínas presentes no núcleo espermático interferem no desenvolvimento embrionário inicial e por quais mecanismos. Dos ovócitos clivados aproximadamente metade atingiu o estágio de blastocisto (53,6%), levando à considerações sobre a interferência das proteínas identificadas e suas correlações positivas com o desenvolvimento embrionário.

O espermatozoide já em sua formação sofre ação da SPATA6 que promove a ligação entre a cabeça e cauda, encaminhando a célula formada para a fase de capacitação espermática onde a PKA C-alpha age regulando a motilidade espermática e promovendo o incremento dos batimentos flagelares, mesmo sitio de atuação do FAM71D que também levam à motilidade progressiva, em conjunto permitem maior probabilidade de encontro com o ovócito a partir da ação complementar da Coiled-coil domain-containing protein 63 que confere ao gameta masculino a capacidade de movimentar-se sistematicamente em direção ao ovócito.

O Beta-nerve growth factor (Beta-NGF) além de atuar na diferenciação, promovendo a produção de testosterona, estimula a motilidade espermática e facilita reações do acrosoma permitindo atingir o gameta feminino em menor tempo e em melhores condições de fecundação, entretanto características não atribuíveis as proteínas do núcleo espermático.

A presença da Histone H2A.J mostra a necessidade em se manter a qualidade das células para a fecundação, sua presença possivelmente sinaliza ao sistema imune a necessidade de selecionar células senescentes impedindo o desenvolvimento de material

genético com algum grau de comprometimento e, portanto menor probabilidade de viabilidade, enquanto o TCP-1 γ age na interação espermatozoide-ovócito através da ligação com a zona pelúcida, função também executada pela Serpin A5.

A qualidade do gameta ou da célula recém-formada dá ao processo a condição para o desenvolvimento até o estágio de blastocistos e a contribuição de proteínas como a Acyl-protein thioesterase (APT-1) atuando no trânsito de substâncias e sinalizando a ocorrência de processos biológicos, no mesmo sentido a ribosomal protein S8 a atuação inibindo a expressão exacerbada de proteínas ribossomais e regulando a síntese proteica, favorecem o desenvolvimento embrionário.

Ainda com vistas à manutenção desta qualidade, as proteínas “ribosomal protein L9”, SPCS3 são responsáveis pelo controle e redução de estruturas anômalas por conformação e codificação além de desvios de translação, e viabilidade celular pelo controle de processos proteolíticos, respectivamente, em atividade e mecanismo semelhante e compartilhado pela Serine racemase de característica multigênica; em destaque podemos ainda apresentar a Succinate-CoA ligase em sua capacidade única de produzir energia para o metabolismo celular ainda que na ausência de oxigênio, sendo estas condições atribuíveis também às atividades proteicas ocorridas no núcleo dos espermatozoides.

Cinco foram as proteínas com influência negativa no processo de fecundação:

- Prohibitin-2 repressor nuclear de receptores de estrógeno também atua como inibidor de crescimento embrionário [45,65],
- Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) retarda a mitofagia espermática na fertilização [45],
- Cytochrome c oxidase subunit 2 que exerce importante função determinando o ritmo para o metabolismo oxidativo mitocondrial e a síntese de ATP [66] parece apresentar-se em maior concentração no período durante o verão e pré-fertilização [67] fatores

que nos levam a acreditar que não se trata de um bom sinalizador de fertilidade, exceto sob condições bastante específicas;

- NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 e NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 [68] foram descritas associadas à mitocôndrias, indicando a extrema necessidade de energia para a fecundação e início do desenvolvimento embrionário, assim distúrbios que possam ocorrer nos precursores mitocondriais ou nas transformações pelas quais passam as mitocôndrias espermáticas pré-fertilização podem interferir negativamente com este processo.

Fica claro que a correlação entre a disponibilização de energia é fator limitante à fecundação, já que o processo de fecundação depende de alto gasto de energia.

Interferiram negativamente com desenvolvimento embrionário inicial, as seguintes proteínas:

- Heat shock protein beta-9 (HspB9) proteína testículo-específica aumenta sua expressão com a idade mantendo sua concentração após a maturidade sexual, em bodes se expressa mais intensamente durante o período de acasalamento e estação quente do ano, aparentemente regulando o metabolismo testicular quando em estresse térmico [42]; é um marcador de estresse térmico testicular, uma das principais causas de subfertilidade temporária em touros
- Acetyl-CoA acetyltransferase (ACAT1) expressa na peça intermediária do espermatozoide (região mitocondrial) demonstra a possibilidade de fontes alternativas de energia envolvendo a oxidação de cadeias de ácidos graxos [69];
- Limbin (EVC2 LBN) proteína nuclear expressa no osso cranial, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e rins de ratos, associado à formação óssea atua na osteogênese e desenvolvimento esquelético, entretanto é associado também a quadros de nanismo por condrodisplasia em bovinos [70, 71];

- 60S ribosomal protein L12 (RPL12) ativador de transcrição mitocondrial, existem evidências que pode atuar como facilitador de transição para o início do alongamento, pode ainda recrutar fatores de translação e controlar esta atividade no ribossomo [71, 72];
- DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2 (DNA2) proteína multifuncional descrita em mitocôndrias, mas também relatada no núcleo celular, envolvida na replicação do DNA e reparos recombinantes importantes na estabilidade genômica;
- Activated CDC42 kinase 1 (ACK-1) exerce papéis diversos no crescimento e diferenciação celular, dependendo do tipo de célula, pela transdução ativada por sinalizadores RAS (sinalizadores celulares de transdução) modificando células em mamíferos [73];
- Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2 (Mitochondrial nucleoid factor 1) (UQCC2 MNF1) proteína mitocondrial associada à nucleóides atua como regulador da organização e metabolismo do DNA mitocondrial (mtDNA), fortemente associado com a membrana interna [74];
- 40S ribosomal protein S7 (RPS7) associada à integridade dos ribossomos, produz modificações em meio à ambiente eletrostático alterado [75], estudos [3] pontam ainda que a RPS7 pode acelerar o ciclo celular (G2-M) durante o inicio do desenvolvimento embrionário de Zebrafish.

As proteínas mitocondriais RPL12, Mitochondrial nucleoid factor 1 e ACAT1 demonstram o fundamental papel do espermatozoide ainda durante o estágio inicial de multiplicação celular embrionária, ativando a transcrição mitocondrial, atuando na regulação metabólica (Mitochondrial nucleoid factor 1) ou sinalizando falhas do processo e a busca por fontes alternativas ou compensatórias de energia para o desenvolvimento embrionário inicial.

Enquanto a detecção das proteínas, EVC2 LBN e DNA2 indicam falhas que podem comprometer as clivagens iniciais, mas se tornam ainda mais significativas na continuidade do processo (blastocistos), quer seja pelo comprometimento desde a diferenciação até a maturação espermática (HspB9), sua composição estrutural (EVC2 LBN) ou reparos pré ou pós-fertilização, tanto associado à função mitocondrial quanto ao material genético nuclear (DNA2).

Destacam-se três proteínas nucleares dos espermatozoides, acelerando o ciclo celular durante o desenvolvimento embrionário inicial, função não descrita em mamíferos (RPS7), interferindo no crescimento e na diferenciação celular, de alguns tipos celulares (ACK-1) e, envolvidas na replicação do DNA e reparos recombinantes, fatores que podem ser associados à queda na taxa de multiplicação e diferenciação celular até o estágio de blastocistos.

A proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) apresentou correlação negativa entre a taxa de formação de blastocisto e fecundação, atua no reconhecimento e eliminação de mitocôndrias espermáticas durante o desenvolvimento embrionário pré-implantação [45]. Sua ação contrasta com a da Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 (E2) de correlação positiva com blastocistos, proteína sinalizadora para ação proteossomica, através da ubiquitinação modificando cadeias proteicas quanto sua localização, atividade ou estabilidade, promovendo a homeostase [76]. O bloqueio da expressão da VCP pode atrasar a mitofagia espermática interferindo no desenvolvimento embrionário pré-implantação, por outro lado o complexo ubiquitina-proteassoma contribui para a degradação da mitocôndria espermática facilitando o processo de fertilização.

F-actin-capping protein subunit beta (CapZ beta) e Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PP1G) apresentam correlação positiva com a fecundação e desenvolvimento embrionário, respectivamente, e fecundação. E, coincidentemente atuam na diferenciação/maturação do gameta masculino, enquanto a PP1G

atua na espermiogênese bloqueando a apoptose, também atua na conformação estrutural (flagelos) do espermatozoide induzindo-o a uma fertilidade normal [32]. Também relacionada ao movimento da cauda a proteína CapZ beta age na estabilidade e orientação da atividade motora do espermatozoide (complexo dineína) e na dinâmica de mitose dos microtubulos [77]. Com estas informações concluímos que, neste grupo, a formação e diferenciação celular associada à atividade motora do espermatozoide influenciam diretamente e de maneira positiva o processo de fecundação.

Chega-se à conclusão que a motilidade espermática influência de maneira significativa a fecundação, que os mecanismos associados à motilidade espermática, mesmo que ainda em fase de diferenciação celular ou capacitação, são os mais citados na literatura como promotores ou limitantes da interação espermatozoide-ovócito, e que as reações bioquímicas relacionadas à disponibilização de energia ao espermatozoide interferem de modo significativo no desenvolvimento embrionário inicial.

Em análise quantitativa mais proteínas influenciaram a formação dos blastocistos (22) do que a taxa de clivagem (10). A clivagem apresentou equilíbrio entre os fatores que influenciam a fecundação, tanto positiva (5) quanto negativamente (5), entretanto a formação de blastocistos foi influenciada mais positiva (14) do que negativamente (8) em relação à fecundação pelas proteínas descritas neste estudo.

Nenhuma proteína que foi descrita exclusivamente no núcleo do espermatozoide estabeleceu correlação negativa com a fecundação; as proteínas Prohibitin-2 e Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) são descritas no núcleo e mitocôndria e citoplasma, respectivamente. Em relação a blastocistos e fecundação as proteínas Heat shock protein beta-9 (HspB9), Histone H2A.J (H2a/j) e Protein FAM71D foram descritas exclusivamente no núcleo, enquanto Limbin (Núcleo / Citoesqueleto), DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2 (Núcleo / Mitocôndria), Activated CDC42 kinase 1

(ACK-1) (Núcleo / Endossomo), cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PKA C-alpha) (Membrana / Núcleo / Mitocôndria) apresentaram outras regiões de expressão.

Desta forma, a proteína “Acyl-protein thioesterase 1” que já havia sido encontrada em maior quantidade em touros férteis, também mostrou correlação positiva com as taxas de clivagem e de blastocistos. Assim, fica evidente sua importância no processo de fecundação e no desenvolvimento embrionário, sendo uma proteína com grande potencial para ser utilizada como marcador de fertilidade em touros.

CONCLUSÕES

Espermatozoides de touro possuem na constituição de sua cromatina protamina 1 e 2 e as variações de histonas subH2Bv, H2A.J, H2A.2C, H4, H2B.1, H1.2, H2A.Z, H3.1, H3.3C, H3.3C-like, H1.3, H3.3, H3.2

A proteína Acil-tioesterase 1 (APT-1) e o fator beta de crescimento do nervo (Beta-NGF), favorecem o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário, a proteína do plasma seminal A3 (BSP-3) favorece o processo de fertilização, bem como a Histona H2A.J, a proteína FAM71D, as proteínas ribossomais 40S-S8 e a 60S-L9, o inibidor de serina protease plasmática (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpina A5) e a subunidade alfa catalítica da proteína quinase dependente de cAMP favorecem o desenvolvimento embrionário inicial. Todas estas proteínas possuem potencial para serem utilizadas como marcadoras de fertilidade.

A proteína ATPase do retículo endoplasmático transicional desfavorece o processo de fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial. A subunidade 5 da NADH desidrogenase (ubiquinona) do subcomplexo 1 alfa desfavorece o processo de fertilização e a

proteína de choque térmico beta-9, as proteínas ribossomais 60S-L12 e 40S-S7 e a proteína acetiltransferase do acetil-CoA desfavorecem o desenvolvimento embrionário. Essas seis últimas proteínas possuem potencial para serem utilizadas como marcadoras de subfertilidade.

REFERÊNCIAS

- [1] Gilany K, Lakpour N, Vafakhah M, Sadeghi MR. The Profile of Human Sperm Proteome: a Mini-review. *J. Reprod. Infertil.*, 2011, 12(3):193-199.
- [2] Ashrafzadeh A, Karsani SA, Nathan S. Mammalian Sperm Fertility Related Proteins. *Int. J. Med. Sci.*, 2013, 10(12):1649–1657. <http://www.medsci.org/v10p1649.htm>
- [3] Wang Z, Hou J, Lu L, Qi Z, Sun J, Gao W, Yang G. Small Ribosomal Protein Subunit S7 Suppresses Ovarian Tumorigenesis through Regulation of the PI3K/AKT and MAPK Pathways. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e79117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079117>
- [4] Du Plessis SS, Kashou AH, Benjamin DJ, Yadav SP, Agarwal A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2011, 9:36. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-36>
- [5] Baker MA. The 'omics revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian J. Androl.*, 2011, 13(1):6-10. DOI: 10.1038/aj.2010.62
- [6] Arruda RP, Silva DF, Affonso F J, Lemes KM, Jaimes JD, Celeghini ECC, Alonso M A, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento. Métodos de avaliação da morfologia e função espermatária: momento atual e desafios futuros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 2011, 35(2):145-151.
- [7] Gaviraghi A, Deriu F, Soggiu A, Galli A, Bonacina C, Bonizzi L, Roncada P. Proteomics to investigate fertility in bulls. *Veterinary Research Communications*, 2010, 34(1):S33–S36. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9387-0>

- [8] Selvaraju S, Parthipan S, Somashekhar L, Kolte AP, Krishnan BB, Arangasamy A, Ravindra JP. Occurrence and functional significance of the transcriptome in bovine (*Bos taurus*) spermatozoa. *Sci. Rep.*, 2017, 7:42392. <https://doi.org/10.1038/srep42392>
- [9] Rahman MS, Kwon WS, Pang MG. Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 2017, 84:749–759. <https://doi.org/10.1002/mrd.22810>
- [10] Rahman MS, Lee JS, Kwon WS, Pang MG. Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. *Int. J. Endoc.*, 2013, 2013:11p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/360986>
- [11] Cui Z, Sharma R, Agarwal A. Proteomic analysis of mature and immature ejaculated spermatozoa from fertile men. *Asian J. Androl.*, 2016, 18:735–746. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.164924>
- [12] Byrne K, Leahy T, Holland MK, McCulloch R, Colgrave ML. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics*, 2012, 12(23-24):3559-79. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200133>
- [13] Peddinti D, Nanduri B, Kaya A, Feugang JM, Burgess SC, & Memili E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol.*, 2008, 2:19. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-19>
- [14] Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballesca JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum. Reprod.* 2008, 23(4):783-91. <https://doi.org/10.1093/humrep/den024>
- [15] Swegen A, Curry BJ, Gibb Z, Lambourne SR, Smith ND, Aitken RJ. Investigation of the stallion sperm proteome by mass spectrometry. *Reproduction*, 2015, 149(3):235-44. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0500>

- [16] Soggiu A, Piras C, Hussein HA, De Canio M, Gaviraghi A, Galli A, Urbani A, Bonizzi L, Roncada P. Unravelling the bull fertility proteome. Mol. BioSyst, 2013, 9(6):1188-95. <http://dx.doi.org/10.1039/c3mb25494a>
- [17] AC Lucio, BG Alves, KA Alves, MC Martins, LS Braga, L Miglio, BG Alves, TH Silva, JO Jacomini, ME Beletti. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. Theriogenology, 2016, 86:924–933. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>
- [18] De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip TA. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res., 1989, 24(2):197-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
- [19] Mendonça, Guilherme Arantes. Proteômica da matriz nuclear espermática suína. 2015. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/13140>
- [20] Morandi Filho, Romualdo. Análise da estrutura e identificação de proteínas da cromatina nuclear espermática de bovinos. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12396>
- [21] Bradford M. Anal. Biochem., 1976, 72:248-254.
- [22] Rauch A, Bellew M, Eng J, Fitzgibbon M, Holzman T, Hussey P, Igra M, Maclean B, Lin CW, Detter A, Fang R, Faca V, Gafken P, Zhang H, Whiteaker J, States D, Hanash S, Paulovich A, McIntosh MW. Computational Proteomics Analysis System (CPAS): An Extensible, Open-Source Analytic System for Evaluating and Publishing Proteomic Data and High Throughput Biological Experiments. Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, LabKey Software, Seattle, Washington, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan. J. Proteome Res., 2006, 5(1):112–121. <http://dx.doi.org/10.1021/pr0503533>.

- [23] Maier WM, Nussbaum G, Domenjoud 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 Res*, 1990, 18:1249–54.
- [24] Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, 2007, 8:227. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>.
- [25] Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser LE, Kaya A, Moura A, Sutovsky P, Parrish J, Topper E, Memili E. Sperm Protamine-Status Correlates to the Fertility of Breeding Bulls. *Biol. Reprod*, 2015, 92(4):1–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124255>
- [26] Castro LS, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Visintin JA, Assumpção MEOA. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. *Theriogenology*, 2018, 107:142 – 148. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.006>
- [27] de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics*, 2011, 11(13):2714-26. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000799>
- [28] Mendonça GA, Morandi Filho, R Souza ET, Gaggini TS, Silva-Mendonça MCA, Antunes RC, Beletti ME. Isolation and identification of proteins from swine sperm chromatin and nuclear matrix. *Anim Reprod Sci.*, 2017, 14(2):418-428.
- [29] Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril*, 2012, 97(2):267-74. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036>
- [30] Sillaste G, Kaplinski L, Meier R, Jaakma Ü, Eriste E, Salumets A. A novel hypothesis for histone-to-protamine transition in Bos taurus spermatozoa. *Reproduction*, 2016, 153(3):241-251. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-16-0441>.

- [31] Aul RB, Oko RJ. The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. Mol. Reprod. Dev., 2002, 242:376-387. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0427>
- [32] Soler DC, Kadunganattil S, Ramdas S, Myers K, Roca J, Slaughter T, Pilder SH, Vijayaraghavan S. Expression of Transgenic PPP1CC2 in the Testis of Ppp1cc-Null Mice Rescues Spermatid Viability and Spermiation but Does Not Restore Normal Sperm Tail Ultrastructure, Sperm Motility, or Fertility. Biol. Reprod., 2009, 81(2):343–352. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076398>
- [33] Ma Q, Li Y, Luo M, Guo H, Lin S, Chen J, Du Y, Jiang Z, Gui Y. The expression characteristics of FAM71D and its association with sperm motility. Hum. Reprod., 2017, 32(11):2178–2187. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex290>
- [34] Zhong L, Belote JM. The testis-specific proteasome subunit Prosalpha6T of D. melanogaster is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. Development, 2007, 134(19):3517-25. <https://doi.org/10.1242/dev.004770>
- [35] Han Y, Haines CJ, Feng HL. Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility. Arch. Androl., 2007, 53(4):169-77. <https://doi.org/10.1080/01485010701314032>
- [36] Berg V, Rusch M, Vartak N, Jüngst C, Schauss A, Waldmann H, Frenzel, LP. miRs-138 and -424 control palmitoylation-dependent CD95-mediated cell death by targeting acyl protein thioesterases 1 and 2 in CLL. Blood, 2015, 125(19):2948–2957.
- [37] Nascimento, Rafaella Adalgisa Silva da Associação do polimorfismo do óxido nítrico endotelial (eNOS) T-786C com moléculas do metabolismo lipídico e inflamatório em amostra de mulheres grávidas/ Rafaella Adalgisa Silva do Nascimento – Recife: O Autor, 2013.

- [38] Yang H, Geiger M. Cell penetrating SERPINA5 (Protein C inhibitor, PCI): More questions than answers. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2017, 62:187–193. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.10.007>
- [39] Stewart JL, Mercadante VRG, Dias NW, Canisso IF, Yau P, Imai B, Lima FS. Nerve Growth Factor-Beta, purified from bull seminal plasma, enhances corpus luteum formation and conceptus development in Bos taurus cows. *Theriogenology*, 2018, 106:30-38. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.007>
- [40] Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J. Androl.*, 2012, 14(6):816–821. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.81>
- [41] Boe-Hansen GB, Rego JP, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Burns BM, McGowan MR. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 2015, 162:20-30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.003>
- [42] Xun W, Shi L, Cao T, Zhao C, Yu P, Wang D, Hou G, Zhou, H. Dual Functions in Response to Heat Stress and Spermatogenesis: Characterization of Expression Profile of Small Heat Shock Proteins 9 and 10 in Goat Testis. *BioMed Res. Int.*, 2015, 2015:686239. <https://doi.org/10.1155/2015/686239>
- [43] Zhang Y, Zhang YL, Feng C, Wu YT, Liu AX, Sheng JZ, Cai J, Huang HF. Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology. *Proteomics*, 2008, 8(20):4344-56. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800294>
- [44] Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Olsen JR, Jeffress EJ, Moore DA, Kastelic JP. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2013, 11:103. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-103>

- [45] Song WH, Yi YJ, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P. Autophagy and ubiquitin–proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2016, 113(36):E5261-E5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605844113>
- [46] Biswas U, Hempel K, Llano E, Pendas A, Jessberger R. Distinct Roles of Meiosis-Specific Cohesin Complexes in Mammalian Spermatogenesis. *PLoS Genetic*, 2016, 12(10):e1006389. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006389>
- [47] Akiel MA, Santhekadur PK, Mendoza RG, Siddiq A, Fisher PB, Sarkar D. Tetraspanin 8 mediates AEG-1-induced invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma cells. *FEBS Lett*, 2016, 590(16):2700-8. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12268>
- [48] Jankovičová J, Simon M, Antalíková J, Cupperová P, Michalková K. Role of Tetraspanin CD9 Molecule in Fertilization of Mammals. *Physiol. Res.*, 2015, 64(3):279-93.
- [49] Jankovicova J, Frolikova M, Sebkova N, Simon M, Cupperova P, Lipcseyova D, Michalkova K, Horovska L, Sedlacek R, Stopka P, Antalikova J, Dvorakova-Hortova K. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction*, 2016;152(6):785-793. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0304>
- [50] Lécuyer C, Dacheux JL, Hermand E, Mazeman E, Rousseaux J, Rousseaux-Prévost R. Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biol. Reprod.*, 2000, 63(6):1801-10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1801>
- [51] Swanson K, Gorodetsky S, Good L, Davis S, Musgrave D, Stelwagen K, Molenaar A. Expression of a β -Defensin mRNA, Lingual Antimicrobial Peptide, in Bovine Mammary Epithelial Tissue Is Induced by Mastitis. *Biol. Reprod.*, 2004, 72(12):7311–7314. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7311-7314.2004>
- [52] Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267(14):10149-55.

- [53] Contrepois K, Coudereau C, Benayoun BA, Schuler N, Roux PF, Bischof O, Mann C. Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat. Commun.*, 2017, 8:14995. <https://doi.org/10.1038/ncomms14995>
- [54] Young SAM, Miyata H, Satouh Y, Kato H, Nozawa K, Isotani A, Ikawa M. CRISPR/Cas9-Mediated Rapid Generation of Multiple Mouse Lines Identified Ccdc63 as Essential for Spermiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(10):24732–24750. <https://doi.org/10.3390/ijms161024732>
- [55] Won SJ, Davda D, Labby KJ, Hwang SY, Pricer R, Majmudar JD, Armacost KA, Rodriguez LA, Rodriguez CL, Chong FS, Torossian KA, Palakurthi J, Hur ES, Meagher JL, Brooks CL, Stuckey JA, Martin BR. Molecular mechanism for isoform-selective inhibition of acyl protein thioesterases 1 and 2 (APT1 and APT2). *ACS Chem. Biol.*, 2016, 11(12), 3374–3382. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00720>
- [56] Merianos HJ, Wang J, Moore PB. The structure of a ribosomal protein S8/spc operon mRNA complex. *RNA*, 2004, 10(6):954–964. <https://doi.org/10.1261/rna.7030704>
- [57] Dun MD, Smith ND, Baker MA, Lin M, Aitken RJ, Nixon B. The Chaperonin Containing TCP1 Complex (CCT/TRiC) Is Involved in Mediating Sperm-Oocyte Interaction. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(42):36875–36887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.188888>
- [58] Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature*, 1992, 358:245–248. <https://doi.org/10.1038/358245a0>
- [59] Naganathan A, Wood MP, Moore SD. The Large Ribosomal Subunit Protein L9 Enables the Growth of EF-P Deficient Cells and Enhances Small Subunit Maturation. *PLoS ONE*, 2015, 10(4):e0120060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120060>

- [60] Meyer HA, Hartmann E. The Yeast SPC22/23 Homolog Spc3p Is Essential for Signal Peptidase Activity. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:13159-13164.
- [61] Magueresse-Battistoni, B. Serine proteases and serine protease inhibitors in testicular physiology: the plasminogen activation system. *Reproduction*. 2007, 134:721-729. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0114>
- [62] Yuan S, Stratton CJ, Bao J, Zheng H, Bhetwal BP, Yanagimachi R, Yan W. Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head-tail conjunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015, 112(5):E430-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424648112>
- [63] Phillips D, Aponte AM, French SA, Chess DJ, Balaban RS. Succinyl-CoA Synthetase is a Phosphate Target for the Activation of Mitochondrial Metabolism. *Biochemistry*, 2009, 48(30):7140–7149. <https://doi.org/10.1021/bi900725c>
- [64] Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, Aksu I, Guvendi G, Uysal N. Potential Novel Biomarkers for Diabetic Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Nerve Growth Factor Beta and Vascular Endothelial Growth Factor, Dis. Markers, 2014, Article ID 108106, 7 pages.
- [65] Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1793(1):27-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.013>
- [66] Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, 53(6):1252–1263. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021>
- [67] Chakrabarti R, Walker JM, Chapman EG, Shepardson SP, Trdan RJ, Curole JP, Watters GT, Stewart DT, Vijayaraghavan S, Hoeh WR. Reproductive Function for a C-terminus Extended, Male-Transmitted Cytochrome c Oxidase Subunit II Protein Expressed in Both

Spermatozoa and Eggs. FEBS Letters, 2007, 581(27):5213–5219.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.006>

[68] Marreiros BC, Sena FV, Sousa FM, Oliveira ASF, Soares CM, Batista AP, Pereira, MM. Structural and Functional insights into the catalytic mechanism of the Type II NADH:quinone oxidoreductase family. Sci. Rep., 2017, 7:42303. <https://doi.org/10.1038/srep42303>

[69] Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. Mol. Cell Proteomics, 2013, 12(2):330–342. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.020552>

[70] Takeda H, Takami M, Oguni T, Tsuji T, Yoneda K, Sato H, Ihara N, Itoh T, Kata SR, Mishina Y, Womack JE, Moritomo Y, Sugimoto Y, Kunieda T. Positional cloning of the gene *LIMBIN* responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2002, 99(16):10549–10554. <https://doi.org/10.1073/pnas.152337899>

[71] Surovtseva YV, Shutt TE, Cotney J, Cimen H, Chen SY, Koc EC, Shadel GS. Mitochondrial Ribosomal Protein L12 selectively associates with human mitochondrial RNA polymerase to activate transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2011, 108(44):17921–17926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108852108>

[72] Bernadó P, Modig K, Grela P, Svergun DI, Tchorzewski M, Pons M, Akke M. Structure and Dynamics of Ribosomal Protein L12: An Ensemble Model Based on SAXS and NMR Relaxation. Biophys J., 2010, 98(10):2374–2382. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.012>

[73] Nur-E-Kamal A, Zhang A, Keenan SM, Wang XI, Seraj J, Satoh T, Meiners S, Welsh WJ. Requirement of activated Cdc42-associated kinase for survival of v-Ras-transformed mammalian cells. Mol. Cancer Res., 2005, 3(5):297-305. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-04-0152>

- [74] Sumitani M, Kasashima K, Ohta E, Kang D, Endo H. Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids. *J Biochem*, 2009, 146(5):725-32. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp118>
- [75] Sripati CE, Cuny M. Phosphorylation of a 40S ribosomal subunit protein in Tetrahymena. Lack of correlation with cellular growth and ribosome stability. *Eur. J. Biochem.*, 1987, 162(3):669-74 <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10689.x>
- [76] Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, 10(11):755–764. <https://doi.org/10.1038/nrm2780>
- [77] di Pietro F, Valon L, Li Y, Goïame R, Genovesio A, Morin X. An RNAi Screen in a Novel Model of Oriented Divisions Identifies the Actin-Capping Protein Z β as an Essential Regulator of Spindle Orientation. *Curr. biol.*, 2017, 27(16):2452–2464. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.055>

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o estudo dos micro-RNAs foi possível identificar que os miRNAs bta-miR-380-5p, bta-miR-155, bta-miR-122, bta-miR-30c e bta-miR-34a foram diferencialmente expressos em touros férteis e subférteis, carecendo de estudos mais específicos para a determinação de seus mecanismos de ação. No entanto, cabe considerá-los como possíveis marcadores não somente de fertilidade em touros, mas também marcadores da causa da subfertilidade, tais como injúria testicular, processo de fertilização propriamente dito e desenvolvimento embrionário inadequado. Ou seja, ficou demonstrado que existem diferenças quanto ao conteúdo de miRNAs em touros férteis e subférteis, no entanto, não foi possível identificar um único miRNA que seja diferencialmente expresso em todos os touros subférteis, provavelmente por serem subfertilidade de causas diferentes.

Já o estudo das proteínas nucleares de touros férteis e subférteis demonstrou a existência de protamina 2 em espermatozoides de touro, o que era questionável até o momento. Também foi possível verificar que existem abundantes variações de histonas (subH2Bv, H2A.J, H2A.2C, H4, H2B.1, H1.2, H2A.Z, H3.1, H3.3C, H3.3C-like, H1.3, H3.3, H3.2), inclusive em touros férteis, demonstrando que a presença de histonas na cromatina de espermatozoides não caracteriza erros na espermiogênese, como já foi pensado anos atrás. Além disso, foi possível identificar proteínas que influenciam a fertilidade do touro, favorecendo ou desfavorecendo o processo de fertilização ou o desenvolvimento embrionário. A proteína Acil-tioesterase 1 (APT-1) e o fator beta de crescimento do nervo (Beta-NGF), favorecem o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário, a proteína do plasma seminal A3 (BSP-3) favorece o processo de fertilização, bem como a Histona H2A.J, a proteína FAM71D, as proteínas ribossomais 40S-S8 e a 60S-L9, o inibidor de serina protease plasmática (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpina A5) e a subunidade alfa catalítica da proteína

quinase dependente de cAMP favorecem o desenvolvimento embrionário inicial. Todas estas proteínas possuem potencial para serem utilizadas como marcadoras de fertilidade. Já a proteína ATPase do reticulo endoplasmático transicional desfavorece o processo de fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial. A subunidade 5 da NADH desidrogenase (ubiquinona) do subcomplexo 1 alfa desfavorece o processo de fertilização e a proteína de choque térmico beta-9, as proteínas ribossomais 60S-L12 e 40S-S7 e a proteína acetyltransferase do acetil-CoA desfavorecem o desenvolvimento embrionário. Essas seis últimas proteínas possuem potencial para serem utilizadas como marcadoras de subfertilidade.

Enfim, o presente estudo possibilitou verificar que não existe um marcador molecular único para diferentes tipos e causas de subfertilidade. Desta forma, cabem novos estudos para identificar conjuntos de marcadores moleculares que cubram a maioria dos tipos de subfertilidade, podendo até mesmo indicar possíveis causas.