

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**Perfil proteômico da cabeça de espermatozoides de touros férteis e subférteis e sua correlação com o desenvolvimento embrionário inicial**

**Pollyanne Giovanna De Morais Cunha**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG  
Julho – 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**Perfil proteômico da cabeça de espermatozoides de touros férteis e subférteis e sua correlação com o desenvolvimento embrionário inicial**

**Pollyanne Giovanna De Morais Cunha**

Dr. Marcelo Emilio Beletti

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG  
Julho – 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**Perfil proteômico da cabeça de espermatozoides de touros férteis e subférteis e sua correlação com o desenvolvimento embrionário inicial**

**Pollyanne Giovanna de Morais Cunha**

Marcelo Emilio Beletti  
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do

Curso de Biotecnologia em   /  /  

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG  
Julho – 2018

*Aos meus pais e a minha irmã, por quem tenho imensa admiração e gratidão, que com carinho me incentivaram e me apoiaram ao longo da minha trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço, e dedico este trabalho a Deus, o qual me deu forças pra chegar até aqui, ele que sempre me carregou nos braços e cuidou de mim como se eu fosse um pedaço teu, merece todo meu amor e minha eterna gratidão.

Agradeço a minha família Alex Morais (meu eterno anjo), Fábio Cunha e Pâmella Morais, sem vocês sem sombra de dúvidas eu não teria conseguido chegar até aqui, agradeço vocês por cuidar de mim, me ensinar ser a cada dia uma pessoa melhor, por serem o meu porto seguro, o motivo da minha felicidade, e por sempre deixar o melhor de vocês em mim, vocês são e sempre serão o meu eterno motivo para sorrir! Vocês são tudo que eu tenho e com toda certeza sempre serão os meus melhores professores. Dinheiro algum do mundo poderia comprar o amor que sinto por vocês.

A você meu amor Fábio Serafim, por tudo que tem sido pra mim, encontrei você e sua família quase no fim dessa jornada e vocês mal sabem o quanto fizeram por mim nesse intervalo de tempo. Você tem me feito forte, tem tornado os meus dias mais curtos e ao mesmo tempo mais longos pela saudade, me fez querer ainda mais esse fim, em muitas vezes você segurou as minhas crises, e me fez enxergar que tudo seria passageiro, acredite como tudo na minha vida, esta fase também com você ao meu lado fez mais sentido.

Agradeço meu orientador Marcelo Emilio Beletti, por ter me aceito como sua orientanda, e ter me dado a oportunidade de realizar este projeto, por todo ensinamento, paciência e comprometimento.

Agradeço à todos do grupo de pesquisa, em especial minha co-orientadora e amiga Amanda Nonato, a qual teve toda paciência para me ensinar, me apoiar, me aconselhar, e me dar seu colo nos momentos difíceis, agradeço a você Luana Felix que além de parceira profissional e prima, se tornou a melhor das melhores parceira de vida, quantas coisas passamos

juntas e você com esse seu jeito único de ser esteve ali pra me dar as mãos e sorrir me fazendo acreditar que no outro dia, tudo ficaria bem, levo comigo cada sorriso, e tropeços que juntas a gente deu.

A todos familiares e amigos, em especial a vocês tia Juliana Borges, meus amigos Henrique Lara e Alex Junior, e ao grupo Lovs Cobrs, por sempre estarem ao meu lado, agradeço por acreditar em mim, terem me aconselhado a nunca desistir do meu sonho, terem sido meu apoio nos momentos difíceis, e ao longo do tempo terem me coberto de amor e carinho.

Aos membros da banca Muller Carrara e Romualdo Filho, não sabem o quanto sou grata a Deus por ter colocado vocês em meu caminho, agradeço por toda atenção, disponibilidade de tempo ao meu trabalho, e também o ombro amigo.

De maneira geral, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, a ajuda de vocês foi fundamental.

Muito obrigada!

## RESUMO

Proteínas específicas da cromatina podem conferir ao espermatozoide maior habilidade de fecundação e favorecer o desenvolvimento embrionário. O presente estudo objetivou analisar o perfil proteômico da cabeça do espermatozoide de touros férteis e subférteis e sua correlação com o desenvolvimento embrionário inicial a fim de identificar proteínas com potencial de biomarcadores. Para identificar e quantificar proteínas do núcleo espermático por espectrometria de massa avançada, foram utilizadas amostras de sêmen de quatro touros (dois férteis e dois subférteis), as quais também foram utilizadas em rotinas de produção in vitro de embriões (PIVEs). Dentre proteínas nucleares e de outros compartimentos do espermatozoide e do plasma seminal, foram identificadas 14 proteínas que podem favorecer e oito que podem desfavorecer o desenvolvimento embrionário inicial. Destacaram-se como possíveis proteínas que favorecem o desenvolvimento embrionário a Acil-tioesterase 1 (APT-1), a Histona H2A.J, o fator beta de crescimento do nervo (Beta-NGF), proteína FAM71D, proteínas ribossomais 40S-S8 e a 60S-L9, o inibidor de serina protease plasmática (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpín A5), e a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PKA C-alpha). E como possíveis proteínas que prejudicam o desenvolvimento embrionário destacaram-se a proteína de choque térmico beta-9, as proteínas ribossomais 60S-L12 e 40S-S7 e a proteína acetiltransferase do acetil-CoA.

**Palavras-chave:** Proteínas Nucleares, Sêmen, Marcadores.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	2
2.1 Objetivo Geral .....	2
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	2
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	3
<b>3.1 Local e animais</b> .....	3
3.2 Análise Proteômica .....	3
3.2.1 Preparo das amostras .....	3
3.2.2 Isolamento de cabeças e caudas .....	3
3.2.3 Extração da Cromatina e Matriz Nuclear .....	4
3.2.4 Quantificação de Proteínas .....	5
3.2.5 Preparação das Amostras .....	5
3.2.6 Análise por espectrometria de massas avançada .....	6
<b>3.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões</b> .....	6
3.3.1 Obtenção e seleção de ovócitos .....	6
3.3.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV) .....	7
3.3.3 Seleção espermática .....	7
3.3.4 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) .....	7
3.3.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) .....	8
<b>3.4 Análise Estatística</b> .....	8
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	9
<b>4.1 Resultados PIVEs</b> .....	9
<b>4.2 Identificação das proteínas e suas correlações com o desenvolvimento embrionário inicial.</b> 9	
4.2.1 Proteínas com correlação positiva com a taxa de blastocistos .....	10
4.2.2 Proteínas com correlação negativa com a taxa de blastocistos .....	16
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	22
<b>REFERÊNCIA</b> .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é considerado um dos principais atores de produção e comercialização de carne bovina no mundo, afim de se ter a constante evolução desta produção e comercialização, é observado em laboratórios a realização da análise de fertilidade dos touros, por meio de amostras contendo espermatozoides do mesmo.

Espermatozoides são células que inicialmente são encontradas no testículo em estado imóvel e inerte, porém ao percorrerem naturalmente o trato reprodutivo, tornam-se capazes de promover a fecundação, por meio de processos bioquímicos que são regulados por inúmeras proteínas e mecanismos desconhecidos que ali acontecem (ASHRAFZADEH et al., 2013). Rotineiramente, a fertilidade de espermatozoides bovinos é avaliada pelo método espermograma, que consiste na avaliação de características como motilidade, morfologia espermática, vigor e concentração (BELETTI et al., 2004), no entanto, touros subfêrteis podem apresentar motilidade espermática e morfologia normais (BELETTI e MELLO, 1996). Assim, o espermograma têm deixado lacunas ao tentar explicar falhas reprodutivas em animais com características espermáticas morfológicas normais.

Proteínas específicas da cromatina podem conferir ao espermatozoide maior habilidade de fecundação e maior capacidade de desenvolvimento embrionário, DNA, e dentre outras estruturas internas da célula espermática, sendo essas não analisadas pelo espermograma (BELETTI et al., 2004). As proteínas são consideradas direcionadoras de manifestações relativas a vida, e executoras de funções fisiológicas, desta forma o conhecimento de suas estruturas e funções podem explicar alterações patológicas e mecanismos fisiológicos (WHANG et al., 2013). Alguns estudos sugerem que proteínas nucleares e alterações na cromatina, podem estar altamente correlacionadas com a capacidade de fertilidade (FRASER e STRZEZEK,2007), e também com o desenvolvimento embrionário. Em núcleos de espermatozoides maduros humanos, há presença de proteínas que estão relacionadas ao metabolismo da cromatina,

proteínas cuja função é a ligação de DNA aos fatores de transcrição, em células que teoricamente sua transcrição é inativa (OLIVA et al., 2009).

A análise proteômica vem contribuindo para a melhor compreensão da função e disfunção do espermatozoide, estudando efeitos patológicos ou fisiológicos na reprodução (DU PLESSIS et al., 2011), e busca descrever e caracterizar produtos gênicos e sua ação regulatória celular (BAKER,2011). Uma comparação de perfis de expressão proteica, entre espermatozoides férteis e subférteis, pode ajudar na identificação de proteínas como biomarcadores a serem utilizadas a campo, ou no desenvolvimento de drogas contra a infertilidade (PARK et al., 2012). Sabendo que, proteínas específicas podem estar altamente relacionadas com a fertilidade do touro, a fim de compreender melhor a funcionalidade da cromatina paterna, transmitida ao ovócito após a fertilização, e ampliar catálogos de proteínas nucleares de espermatozoide, o presente trabalho propõe a análise do perfil proteômico da cabeça dos espermatozoides de touros férteis e subférteis e sua correlação com o desenvolvimento embrionário inicial.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar o perfil proteômico da cabeça de espermatozoides de touros férteis e sub-férteis e sua correlação com o desenvolvimento embrionário inicial.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a.) Isolar e identificar proteínas da matriz nuclear espermática utilizando a proteômica.
- b.) Correlacionar o perfil proteômico da matriz celular espermática com as taxas blastocistos na PIVE.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e animais**

Foram utilizadas doses de sêmen de dois touros férteis e dois touros subférteis pertencentes à Universidade Federal de Uberlândia sediados à Fazenda Capim Branco. A coleta de sêmen foi realizada pelo método de eletroejaculação e os touros foram considerados férteis ou subférteis após a realização do exame andrológico e espermograma. Além disso, foram utilizadas doses de sêmen, adquiridas de empresas especializadas de um touro da raça Nelore, previamente utilizado em rotinas de fertilização in vitro pelo grupo de pesquisa, como controle das rotinas de FIV.

#### **3.2 Análise Proteômica**

##### **3.2.1 Preparo das amostras**

Doses de sêmen (250 µl) foram descongeladas por 30s em banho maria a 36°C e foram transferidas para tubos cônicos de 15mL contendo 8mL de solução tampão (50mM Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 7,5). Após homogeneização e centrifugação a 750 x g por 15 min à 4°C, o sobrenadante foi removido, o sedimento foi ressuspendido em 8mL da mesma solução e a centrifugação foi repetida por três vezes nas mesmas condições que a primeira. O sedimento obtido foi ressuspendido em 1,5mL da solução tampão e após sonicação a 4°C por 20 min (com pulsos de 30 s e intervalos de 5 s), foi realizada centrifugação a 1000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2,0mL de solução tampão (50mM Tris-HCl, sacarose 1,1 M, pH 7,5).

##### **3.2.2 Isolamento de cabeças e caudas**

A separação de cabeças e caudas dos espermatozoides foi realizada por ultracentrifugação assim como descrito (MENDONÇA,2015). Para tanto, um gradiente com três camadas foi

preparado, em um tubo para ultracentrífuga de 12mL, da seguinte forma: primeira camada com 2mL de cloreto de céσιο (2,82 M, 25mM de Tris-EDTA, 5mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5% Triton X-100); segunda camada com 4mL de sacarose 2,2 M; última camada com 2mL de amostra em solução tampão (50mM Tris-HCl e sacarose 1,1 M, pH 7,5). A ultracentrifugação foi feita a 75.600 x g por 45 min a 4°C. Posteriormente o sobrenadante, contendo as caudas dos espermatozoides, foi cuidadosamente retirado, e o sedimento que continha as cabeças foi ressuspenso em solução tampão (Tris 25mM). Foram realizadas três lavagens por centrifugação a 1000 x g por 30 min a 4°C na mesma solução, a fim de retirar os resíduos de cloreto de céσιο.

### **3.2.3 Extração da Cromatina e Matriz Nuclear**

A extração da cromatina foi realizada de acordo com (MORANDI,2013), com algumas modificações. As cabeças isoladas foram ressuspendidas em 500 µL de solução (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 1% de Triton X-100, acrescida de 5µL de coquetel inibidor de protease) e foi realizada agitação por *vortex* durante 10min a temperatura ambiente. Esse procedimento objetivou remover o acrossoma e todas as membranas, deixando o núcleo condensado e ligado ao envoltório nuclear e alguns resquícios de material perinuclear.

As amostras foram lavadas três vezes por centrifugação a 1.100xg por 30 min com 1,5 mL de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Após a última lavagem, o material foi ressuspenso em 500 µL de tampão de descondensação 40 mM 1,4-ditiotreitol (DTT), 0,25 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>4</sub>, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, acrescido de 5 µL de coquetel inibidor de protease e foi realizada incubação por 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 4000 U de desoxiribonuclease I livre de RNase e foi realizada homogeneização por *vortex* durante 60 min a temperatura ambiente. A amostra foi precipitada, evaporada em estufa à 43°C overnight e acondicionada até o processamento.

### **3.2.4 Quantificação de Proteínas**

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

### **3.2.5 Preparação das Amostras**

A preparação das amostras para a espectrometria de massas avançada consistiu em 3 etapas principais, descritas resumidamente: i) redução e alquilação das proteínas, ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina e iii) “clean up/desalting” das amostras.

Para a redução das pontes de dissulfeto das proteínas as amostras foram submetidas à adição de DTT (ditiotreitól), na proporção 1 mg DTT/mg proteína seguida de incubação por 2 h em temperatura ambiente e posterior alquilação pela adição de iodoacetamida (I.A) na proporção 3 mg I.A./mg proteína e incubação por 1 h em temperatura ambiente, na ausência de luz.

Para a digestão enzimática as amostras foram incubadas com 1 µg de tripsina (Promega, V511A, Lote 30551310) à 37°C overnight, a tripsina irá quebrar as proteínas e peptídeos onde tenha L-lisina e L-arginina.

Previamente a aplicação das amostras, no espectrômetro de massas, foi realizado o “clean-up/desalting” utilizando-se a coluna OASIS HLB Cartridge 1cc (cat. number: 186000383, Waters), conforme recomendação 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%. Em seguida a amostra foi seca em speed vac e aplicada em espectrômetro de massas.

### **3.2.6 Análise por espectrometria de massas avançada**

As amostras digeridas, conforme descrito anteriormente, foram secas e 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” (RAUCH et al., 2006). Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade foram então agrupados em proteínas, utilizando-se o algoritmo “Protein Prophet” e uma lista de identificações com taxa de erro inferior a 2.0% foi gerada. Utilizou-se um banco de dados específicos de bovinos e todas as análises foram realizadas em duplicata.

Todas as proteínas identificadas tiveram a quantidade de peptídeos recuperados, transformada em porcentagem do número total de peptídeos recuperados da amostra, desta forma, foi gerada uma lista de todas as proteínas identificadas de forma semiquantitativa.

## **3.3 Produção *in vitro* de embriões**

Foram realizadas rotinas de produção *in vitro* de embriões de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia da Reprodução do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Campus de Uberlândia.

### **3.3.1 Obtenção e seleção de ovócitos**

Ovários foram coletados no Frigorífico Luciana, na cidade de Uberlândia, e transportados para o laboratório em solução fisiológica a 30-33°C. A aspiração dos folículos antrais de 3 a 8 mm foi feita com agulha de 19-g acoplada a uma seringa de 10 mL. O fluido folicular obtido foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e, após 15 minutos, o sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 90 x 15 mm e avaliado sob microscópio estereoscópico para a

realização do rastreamento dos ovócitos. Os ovócitos obtidos no rastreamento foram classificados e foram selecionados apenas ovócitos de graus 1, 2 e 3 para o experimento, ou seja, os que apresentaram no mínimo quatro camadas de células do cumulus e citoplasma de colocação uniforme. Os ovócitos não selecionados, considerados atrésicos e desnudos, foram descartados.

### **3.3.2 Maturação *in vitro* (MIV)**

Ovócitos selecionados foram lavados uma vez em meio TCM – 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino) e uma vez em meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL FSH, 5 µg/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Foram transferidos 20 ovócitos por gota de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e foram mantidos por cerca de 22 h em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

### **3.3.3 Seleção espermática**

Uma dose de sêmen foi descongelada por 30 s em banho maria a 36°C e depositada em um tubo cônico de 15 mL contendo 2 mL de meio Sperm-TALP (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina). Após homogeneização e centrifugação por 5 min a 260 x g, o sobrenadante foi descartado e então foi realizada a segunda centrifugação nas mesmas condições que a primeira. Foram transferidos 30 µL do sedimento formado para um microtubo contendo 30 µL de meio Fert-TALP.

### **3.3.4 Fecundação *in vitro* (FIV)**

Os ovócitos maturados foram lavados três vezes em meio Fert-TALP e foram transferidos para gotas de 100 µL, do mesmo meio, cobertas com óleo mineral em placas de petri de

poliestireno de 60 x 15 mm. Gotas foram distribuídas aleatoriamente a fim de compor os grupos experimentais, touros férteis, subférteis e também o grupo de controle da FIV.

Do sedimento previamente separado, como descrito anteriormente, foram retiradas duas alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  para determinar a motilidade progressiva e a concentração em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 25 mil espermatozoides viáveis/ $\mu\text{L}$  e então 8  $\mu\text{L}$  foram utilizados para fecundar cada gota, em seguida, foram incubados por 18 a 20 h em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar, na temperatura de 38,5° e 100% de umidade. A contagem da clivagem foi realizada 48 horas após a FIV.

### **3.3.5 Cultivo *in vitro* (CIV)**

Os prováveis zigotos foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens a fim de remover as células do cumulus, foram lavados três vezes em meio SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83  $\mu\text{g/mL}$  amicacina) e transferidos (no máximo 60 zigotos) para poços de 700  $\mu\text{L}$  do mesmo meio, cobertas por 300  $\mu\text{L}$  óleo mineral em placas de quatro poços. Foram cultivados por 6 dias em estufa, com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , 100% de umidade e temperatura de 38,5°C. A contagem dos blastocistos foi realizada no sétimo dia após a fecundação de acordo com as normas preconizadas pela “International Embryo Transfer Society”.

### **3.4 Análise Estatística**

Como forma de neutralizar parcialmente os efeitos das variáveis não controláveis na PIVE, foi realizada a normalização dos dados obtidos das PIVEs com sêmen de animais avaliados, tendo como referência os resultados obtidos com o touro fértil (touro referência), previamente testado em nossos laboratórios e com excelentes resultados. Para isso, as taxas de blastocistos das amostras de touros avaliados foram transformadas em porcentagem das taxas de blastocistos obtidas com o sêmen do touro referência, na mesma rotina de PIVE. Desta forma,

os efeitos ambientais, da qualidade de ovócitos e outras variáveis desconhecidas foram minimizados.

Uma normalização dos resultados da análise proteômica também foi realizada a fim de se obter um número representativo da quantidade de cada proteína por amostra. Para tanto, o número de peptídeo de cada proteína foi transformado em porcentagem em relação ao número total de peptídeos encontrado na amostra. Para a identificação de possíveis influências da quantidade de cada proteína identificada sobre os processos de desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, foi calculada a correlação entre essa porcentagem de blastocistos obtidos nas PIVEs e a quantidade de cada proteína em cada amostra. Foram consideradas correlações significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados PIVEs

A fertilidade e subfertilidade dos touros foi confirmada pelos resultados obtidos nas PIVEs (Tabela 1), os quais possibilitaram a realização da correlação com os resultados de proteômica dos dois grupos.

**Tabela 1 - Taxa de blastocistos obtida nas PIVEs de touros férteis e subférteis.**

Touros	Taxa de blastocisto (%)	
	Valor bruto	Valor normalizado
Férteis	50,2 <sup>a</sup>	93,32 <sup>a</sup>
Subférteis	3,4 <sup>b</sup>	6,57 <sup>b</sup>

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

### 4.2 Identificação das proteínas e suas correlações com o desenvolvimento embrionário inicial.

Embora a metodologia de isolamento de proteínas do núcleo dos espermatozoide já tenha sido empregada previamente (MENDONÇA, 2015; MORANDI, 2013), os resultados do presente estudo indicam que a fase de isolamento do núcleo não foi tão eficaz como esperado,

tendo em vista que foram observadas diversas proteínas contaminantes de outros compartimentos do espermatozoide e também proteínas do plasma ou diluente seminal, além disso foram identificadas as proteínas DNase I e a quimiotripsina, as quais foram utilizadas na preparação das amostras.

Foram encontradas 766 proteínas, mas somente 289 foram previamente identificadas como sendo nucleares, no entanto, 20 destas proteínas ainda não possuem localização descrita, com isto não se pode eliminar a ideia de que outras proteínas encontradas possam ter sido extraídas do núcleo. Mesmo que algumas proteínas também já tenham sido descritas em outros compartimentos celulares, existe a hipótese de que estas podem também estar presentes no núcleo do espermatozoide bovino, assim é preciso a realização de estudos futuros para se ter o esclarecimento destes achados.

No presente estudo as histonas totalizaram cerca de 5,71% das proteínas identificadas, esta abundância de variáveis de histonas confirma a ideia de que é normal, ou até mesmo necessária, a presença de histonas após a finalização do processo de compactação de cromatina espermática (CARREL, 2012). Em estudo (MENDONÇA et al., 2017) realizado com células espermáticas suínas as histonas totalizaram 2,6% e com espermatozoides humanos estas totalizaram 9,7% (MATEO et al.; 2011).

#### **4.2.1 Proteínas com correlação positiva com a taxa de blastocistos.**

Devido a identificação de grande quantidade de variáveis de proteínas foi impossível realizar a avaliação das proteínas individualmente em estudo único, por isso a ênfase foi dada às proteínas que possuíram correlação significativa com as taxas de blastocistos (porcentagem de ovócitos que após sete dias da fertilização chegaram ao estágio de blastocistos normais) obtidas nas PIVEs. As proteínas que tiveram correlação positiva com a taxa de blastocisto, e portanto, favorecem o desenvolvimento embrionário inicial são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2. 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

#### **4.2.1.1 Histone H2A.J**

É uma variante de H2A pouco estudada, e de acordo com análises filogenéticas é específica de organismos de mamíferos. Estudos realizados, utilizando espectrometria de massa e anticorpo específico, demonstraram que a cromatina de fibroblastos humanos em proliferação ou quiescentes possuem baixos níveis de H2A.J, e que na cromatina de fibroblastos em senescência, com dano persistente ao DNA, são observados altos níveis desta variante. O estudo ainda demonstrou que a diminuição de H2A.J inibe a expressão da resposta imune e genes inflamatórios incluindo muitos associados à SASP (implicada na sinalização da presença de

células senescentes para o sistema imunológico). Esses genes são altamente reprimidos nas células em proliferação para evitar sinais inflamatórios inapropriados na ausência de estresse, mas são altamente expressos em células senescentes. Esses achados sugerem que a Histone H2A.J apresentou correlação positiva com a taxa de blastocistos pois possivelmente impede a ocorrência do desenvolvimento de material genético comprometido ao atuar de forma sinalizadora ao sistema imune que ao ser sinalizado logo irá selecionar células senescentes (CONTREPOIS et al., 2011).

#### **4.2.1.2 Colided-coil domain-containing protein 63**

É fortemente expressa nos testículos e também no cérebro, timo e pulmão em menores níveis. Estudo realizado utilizando CRISPR/ Cas9 para o nocautes simples de Ccdc63, evidenciou que esta proteína é incorporada no complexo dineína (grupo de proteínas essenciais para o movimento flagelar) na fase de espermatogênese, indicando que desempenha papel fundamental na formação de espermatozoides e flagelos durante a espermiogênese, conferindo ao gameta masculino a capacidade de se mover em direção ao ovócito e transferir a informação genética (YOUNG et al., 2015).

#### **4.2.1.3 Acyl-protein thioesterase 1 (APT-1)**

São enzimas que promovem a despalmiteoilação. A palmitoilação é uma modificação pós-traducional que pode influenciar diretamente na localização; mobilidade, função das moléculas e sinalização; sobrevivência e migração celular. A palmitoilação é a única modificação lipídica reversível, indicando que está envolvida em processos dinâmicos. Estudos relatam que APTs são super expressas em células CLL (células primarias de leucemia linfocítica crônica), essa expressão elevada promove menor palmitoilação de proteínas de membrana em células CLL. A CD95 possui um local de palmitoilação, quando os ATPs interagem com o CD95 ocorre a

despalmitoilação que gera impactos na distribuição do CD95 na membrana celular, e logo a resistência à apoptose mediada por CD95 (responsável por emitir sinais apoptóticos) (WON et al., 2016).

#### **4.2.1.4 40S ribossomal protein S8**

Por meio da inibição da unidade de iniciação ribossômica esta é capaz de reprimir a translação de seu próprio mRNA, regulando assim a síntese de proteínas e o acúmulo de proteínas ribossomais (MERIANOS et al., 2004).

#### **4.2.1.5 cAmp-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PKA C-alpha)**

Atua na regulação da motilidade dos espermatozoides, durante a capacitação ocorre a ativação da subunidade catalítica PKA, esta ativação promove o aumento da frequência da batida flagelar, conseqüentemente esse processo favorece a ligação do espermatozoide ao ovócito (ICKWICZ et al., 2012).

#### **4.2.1.6 T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma) (CCT-gamma)**

São chaperonas encontradas em complexo proteico de elevado peso molecular de superfícies de espermatozoide, que desempenham importante papel no mecanismo de interação entre a zona espermática e pelúcida, devido a sua afinidade por receptores localizados na membrana vitelínica (zona pelúcida) (DUN et al., 2011).

#### **4.2.1.7 Protein FAM71D**

Expressa exclusivamente no testículos. Em camundongos foi demonstrado que durante a fase de espermiogênese pode ser encontrada em diferentes seções do testículo, tais como o citoplasma das espermátides, regiões próximas aos acrossomos, extremidades dos núcleos, e

por fim retida no flagelo espermático. Também pode interagir com a proteína calmodulina que apresentam baixa expressão em pacientes com astenozoospermia (motilidade progressiva dos espermatozoides afetada) (MA et al., 2017).

#### **4.2.1.8 60S ribosomal protein L9**

Existem diversos fatores que influenciam a qualidade da síntese proteica, tais como a 60S ribosomal protein L9, responsável por reduzir erros de codificação e desvios no mecanismo de translação (NAGANATHAN et al., 2015).

#### **4.2.1.9 Plasma serine protease inhibitor (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpin A5)**

É descrita como membro da superfamília das proteínas Serpin, que é encontrada no núcleo de algumas células. Além de ser identificadas como um inibidor de proteína C, é também um inativador de proteases. Apesar de ser altamente expressa no trato reprodutivo masculino, sua expressão também já foi demonstrada na pele, no fígado, no coração, no rim, e no trato reprodutivo feminino. Estudos propõem que a Serpin A5 atua em vários níveis no trato reprodutivo masculino, e que qualquer alteração que ocorra durante a fase de maturação no epidídimo pode resultar na infertilidade masculina (YANG e GEIGER, 2017).

#### **4.2.1.10 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 esta relacionada aos processos proteolíticos (MEYER e HARTMANN, 1997).

#### **4.2.1.11 Serine racemase (SRP)**

Proteases são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, estas são fundamentais para quase todos os processos de reparação, manutenção, desenvolvimento de tecidos, crescimento e alteração estrutural. Dentre as proteases estão as endopeptidases responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações internas em polipeptídeos, as endopeptidases são divididas em cinco classes dentre elas se encontra a Serina. A família da serina protease é uma das primeiras famílias proteolíticas multigenicas descrita, esta por sua vez desempenha funções fundamentais na fibrinólise, trombose, coagulação sanguínea e ativação plaquetária, esta é subdividida em 16 família, dentre ela calicreinas, proteína C ativada, e ativadores de plasminogênio (MAGUERESSE, 2017).

#### **4.2.1.12 Spermatogenesis- associated protein 6 (SPATA6)**

É por meio de uma peça intermediária constituída principalmente por colunas segmentadas que a cabeça e a cauda do esperma são unidos. O SPATA 6, descrito como gene espermiogênico específico do testículo e altamente conservado, é fundamental para a formação destas colunas. As colunas segmentadas são montadas por meio do transporte de microfilamentos, este transporte ocorre por meio de miosina específica de espermátides que interagem com SPATA 6, portanto na ausência de SPATA 6 o transporte destes microfilamentos pode ser comprometido, e levar a uma má formação ou ausência completa de colunas segmentadas durante o desenvolvimento da peça de conexão, este acontecimento por sua vez pode promover a formação de espermatozoides acéfalos e a infertilidade do macho (YUAN et al., 2015).

#### **4.2.1.13 Succinate-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha mitochondrial**

Na ausência de oxigênio, esta proteína é a única enzima mitocondrial capaz de produzir ATP por meio da via de fosforilação. Além disso desempenham uma importante função no ciclo do ácido cítrico, no metabolismo da cetona e na síntese do heme (PHILLIPS et al., 2009).

#### 4.2.1.14 Beta-nerve growth fator (Beta-NGF)

É encontrado nos testículos, no epidídimo, nas espermátogônias, nas células de Sertoli, e nas células de Leydig. É responsável por estimular a motilidade dos espermatozoides e facilitar as reações acrossomais das células espermáticas, além disso o NGF propicia a produção de testosterona, e também contribui para a proliferação e diferenciação das células de Leydig (SISMAN et al., 2014).

#### 4.2.2 Proteínas com correlação negativa com a taxa de blastocistos.

As proteínas que tiveram correlação negativa com a taxa de blastocisto, e portanto, desfavorecem o desenvolvimento embrionário inicial estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3. 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
Limbin	-0,97	0,030
60S ribosomal protein L12	- 0,96	0,045
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

#### **4.2.2.1 Heat shock protein beta-9 (HspB9)**

Esta é uma proteína descrita como específica do testículo e como possível marcador de estresse térmico testicular, a sua expressão aumenta com a idade e sua concentração é mantida após a maturidade sexual. Supostamente em bodes, a HspB9 em casos de estresse térmico, regula o metabolismo testicular pois é observado que em período de acasalamento e estação quente do ano a sua expressão se torna mais abundante (XUAN et al., 2015).

#### **4.2.2.2 Acetyl-CoA acetyltransferase**

É uma proteína expressa na região mitocondrial, ou seja, na porção intermediária do espermatozoide. Apresenta a possibilidade de fonte alternativa de energia envolvendo a oxidação de cadeias de ácidos graxos (AMARAL et al., 2013)

#### **4.2.2.3 Limbim (EVC2 LBN)**

Descrita como sendo uma proteína nuclear, é expressa em osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, rins de ratos, e osso cranial (TAKEDA et al., 2002). Apesar de sua função ainda permanecer desconhecida, é sugerido que ela possa ter um importante papel para o desenvolvimento do esqueleto, pois encontra-se associada a quadros de nanismo condrodisplásico em bovinos (SUROVTSEVA et al., 2011).

#### **4.2.2.4 60 S ribossomal protein L12 (RPL 12)**

É descrita como sendo responsável por ativar a transcrição mitocondrial, pode ainda controlar a atividade no ribossomo por meio do recrutamento de fatores de translação (SUROVTSEVA et al., 2011). Além destas funções, quando não está associada aos ribossomos, a mesma possui outra função na transcrição, possivelmente atuando afim de facilitar a transição para o início do alongamento (BERNADÓ et al., 2010).

#### **4.2.2.5 DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2 (DNA2)**

É descrita em mitocôndrias como sendo uma proteína multifuncional, relatada também no núcleo celular, envolvida na replicação de DNA e reparos recombinantes importantes na estabilidade genômica (NUR e KAMAL et al., 2005).

#### **4.2.2.6 Activated cdc42 kinase 1 (ACK-1)**

Desempenha diversas funções no crescimento e diferenciação celular. Por meio da tradução de sinais RAS (sinalizadores celulares de tradução) modifica células em mamíferos.

#### **4.2.2.7 Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2 (Mitochondrial nucleoid fator 1) (UQCC2 MNF1)**

Descrita como sendo uma proteína mitocondrial. Esta quando associada a nucleoides, tem função de regular a organização e metabolismo do DNA mitocondrial (mtDNA) fortemente associado com a membrana interna (SUMITANI et al., 2009).

#### **4.2.2.8 40S ribossomal protein S7 (RPS7)**

Durante início do desenvolvimento embrionário do peixe Zebrafish, esta proteína pode acelerar o ciclo celular (G2-M) (WANG et al., 2013). RPS 7 também pode estar relacionada com a integridade do ribossomo, e quando presente em meio à ambiente eletrostáticos alterado promove modificações (SRIPATY e CUNY,1987).

#### **4.2.1.15 Considerações gerais sobre proteínas com correlação com a taxa de blastocisto**

Foi possível observar que a maior parte das proteínas encontradas deveriam ter associação com a fecundação e não com o desenvolvimento embrionário, sabendo que a maioria delas adentra o ovócito no processo de fecundação, é possível também dizer que além das funções

descritas acima elas podem ter finalidades pós-fecundação. Existe também a probabilidade destas proteínas serem marcadores indiretos, pois elas podem acompanhar outros problemas que não foram identificados no presente trabalho, e assim de alguma maneira poderiam influenciar o desenvolvimento embrionário.

A continuação do processo de diferenciação celular pelo qual a célula embrionária passa, torna indispensável entender melhor até onde as proteínas presentes no núcleo espermático interferem no desenvolvimento embrionário inicial, e quais os mecanismos envolvidos. Aproximadamente metade dos ovócitos clivados atingiu o estágio de blastocisto (53%), evidenciando a possibilidade de interferência das proteínas identificadas, com correlações positivas, no desenvolvimento embrionário.

Após a descrição das proteínas encontradas, a atenção foi voltada para o espermatozoide já formado, em que o gene espermiogênico SPATA 6 é fundamental para a formação da peça de conexão que une a cabeça e a cauda do esperma, contribuindo assim para o direcionamento da célula já formada para a fase de capacitação espermática. Esta fase tem a atuação das proteínas PKA C-alpha (reguladora da motilidade espermática) responsável por promover o aumento da frequência da batida flagelar, e atuação do FAM71D também responsável pela motilidade progressiva, funções estas que favorecem a ligação do espermatozoide ao ovócito. A ação da proteína Coiled-coil domain-containing protein 63 também favorece essa ligação, pois desempenha papel fundamental na formação do espermatozoide e flagelos durante a espermiogênese pois confere maior capacidade do mesmo a movimentar-se sistematicamente em direção ao ovócito e transferir informação genética. A proteína TCP-1-gamma possivelmente favorece a penetração do espermatozoide no ovócito devido a sua afinidade por receptores localizados na membrana vitelínica. O Beta-neve growth fator (Beta-NGF), que além de promover a produção de testosterona atuando na diferenciação, estimula a motilidade dos espermatozoides e facilita reações acrossomais das células espermáticas, permitindo atingir o

gameta feminino em melhores condições e em menos tempo, no entanto estas funções não são relacionadas e nem possuem características de proteínas do núcleo espermático.

A identificação da HISTONE H2A.J demonstra a importância da manutenção da qualidade das células para a fecundação, possivelmente, a sua função é impedir o desenvolvimento de material genético que possa estar comprometido, ou seja diminuir a probabilidade de viabilidade, por atuar de forma sinalizadora ao sistema imune que ao ser sinalizado logo irá selecionar células senescentes.

O processo de desenvolvimento, até a fase de formação de blastocistos, além de depender da qualidade da célula recém-formada ou do gameta, depende também de proteínas como, Acyl-protein thioesterase (APT-1) que atua na sinalização de sinais apoptóticos e trânsito de substâncias, assim como a proteína ribossomal protein S8 que regula a síntese proteica e acúmulo de proteínas ribossomais, assim, ambas contribuem para o desenvolvimento embrionário inicial. Pensando ainda na qualidade, se destacam também a Succinate-CoA ligase única enzima mitocondrial capaz de produzir ATP por meio da via de fosforilação quando na ausência de oxigênio, SPCS3 que é essencial para a viabilidade celular e está relacionada a processos proteolíticos como a clivagem de peptídeos sinalizadores, e ribossomal protein L9 responsável por reduzir erros de codificação e desvios no mecanismo de translação, que pode favorecer a correta expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, e pôr fim a Serine racemase que é uma enzima proteolítica de característica multigênica, assim sendo estas condições também atribuídas às atividades proteicas que ocorrem no núcleo dos espermatozoides.

É possível observar a importância do gameta masculino ainda durante a fase inicial da multiplicação celular embrionária, por meio da presença de proteínas mitocondriais como ACAT 1, que possibilita gerar fontes alternativas de energia para o desenvolvimento

embrionário inicial, Mitochondrial nucleoid fator 1 responsável pela organização e metabolismo do DNA mitocondrial, e a proteína RPL12 ativadora de transcrição mitocondrial.

Das proteínas nucleares das células espermáticas duas se destacaram: ACK-1, cuja função está relacionada com a interferência no crescimento e diferenciação de alguns tipos de células; RPS7, descrita em peixes Zebrafish como responsável por acelerar o ciclo celular, no entanto ainda não foi descrita em mamíferos. Tais funções podem estar relacionadas a diminuição na taxa de diferenciação e multiplicação celular até o estágio de blastocistos.

Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP), cuja função é reconhecer e eliminar as mitocôndrias espermáticas durante o desenvolvimento embrionário, também demonstrou correlação negativa com a taxa de blastocistos (SONG et al., 2016), contrariando a função da Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 (E2) que por sua vez possui correlação positiva com o desenvolvimento de blastocistos, pois promove a sinalização para a ação proteossômica por meio da ubiquitinação, promovendo a modificação de cadeias proteicas quanto a sua atividade, estabilidade ou localização, gerando assim a homeostase (YE e RAPE, 2009). A mitofagia espermática pode ser atrasada por meio do bloqueio da expressão da VCP, esse atraso pode interferir no desenvolvimento embrionário pré-implantacional, porém o complexo ubiquitina-proteassoma pode favorecer a degradação da mitocôndria espermática contribuindo assim para o processo de fertilização.

A proteína Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gama catalytic subunit (PP1G) demonstra correlação positiva com o desenvolvimento embrionário, coincidentemente, ela possui função na maturação e diferenciação do espermatozoide, atuando na estrutura flagelar do espermatozoide favorecendo a fertilidade normal além de atuar no bloqueio da apoptose na fase de espermiogênese (SOLER et al., 2009). Já a F-actin protein subunit beta (CapZ beta) apresenta correlação positiva com a fecundação, também está relacionada ao movimento flagelar e atua na dinâmica de mitose dos microtubulos, na estabilidade e orientação da

atividade motora do espermatozoide (complexo dineína). Com isso é possível observar que, neste grupo, à atividade motora do espermatozoide juntamente com a diferenciação e formação celular, influenciam e favorecem o processo de fecundação.

Contudo pode-se concluir que a motilidade espermática, mesmo que ainda em fase de diferenciação celular ou capacitação, influencia o processo de fecundação. É visto que, em toda literatura relacionada, estes são os mais citados como sendo limitantes ou promotores da interação espermatozoide-ovócito, e que o desenvolvimento embrionário inicial pode sofrer interferência significativa das reações bioquímicas relacionadas à disponibilização de energia ao espermatozoide.

Por meio da análise quantitativa observou-se que ao todo 22 proteínas influenciaram a formação dos blastocistos, e em relação a fecundação, 14 proteínas influenciaram de forma positiva a formação de blastocistos, e 8 influenciaram de forma negativa. Dente as proteínas descritas no presente trabalho apenas Histone H2A.J (H2a/j), Protein FAM 71D e Heat shock protein beta-9 (HspB9), foram descritas exclusivamente no núcleo, sendo o restante das proteínas apresentadas em outras regiões de expressão.

## **5 CONCLUSÃO**

Conclui-se que as proteínas que possuem potencial para serem utilizadas como marcadores de fertilidade são, as proteínas ribossomais 40S-S8 e 60S—L9, Acil-tioesterase 1 (APT-1), fator beta de crescimento do nervo (Beta-NGF), proteína do plasma seminal A3 (BSP-3), Histone H2A.J, FAM 71D, o inibidor de serina protease plasmática (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpín A5), e a subunidade alfa catalítica da proteína cinase dependente de cAMP. E as proteínas que apresentam um possível potencial a serem marcadores de subfertilidade são proteínas ribossomais 60 S-L12 E 40S-S7, ATPase do retículo endoplasmático transicional, a subunidade 5 da NADH desidrogenase (ubiquinona) so subcomplexo 1 alfa, proteína de choque térmico beta-9, e a proteínas acetiltransferase do acetil-CoA.

## REFERÊNCIA

- AMARAL, A. et al. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.12, n.2, p.330-342, 2013.
- ASHRAFZADEH, A. et al. Mammalian Sperm Fertility Related Proteins. **International Journal of Medical Sciences**, v.10, n.12, p.1649-1657, 2013.
- BACKER MA. The 'omics revolution and our understanding of sperm cell biology. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n1, p.6-10, 2011.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v.79, n.1, p.17-23, 2004.
- 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, n.1, p.97-103, 1996.
- BERNADÓ, P. et al. Structure and Dynamics of Ribosomal Protein L12: An Ensemble Model Based on SAXS and NMR Relaxation. **Biophysical Journal**, v.98, n.10, p.2374-2382, 2010.
- BRAD FORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.
- CARREL, DT. Epigenetics of the male gamete. **Fertility and Sterility**, v.97, n.2, p.267-74, 2012.
- Mendonça, GA. et al. Isolation and identification of proteins from swine sperm chromatin and nuclear matrix. **Animal Reproduction**, v. 14, n.12, p.418-428, 2017.
- CONTREPOIS, K. et al. Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. **Nature Communications**, v.8, p.14995, 2017.
- DU PLESSIS, SS et al. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, p.36, 2011.
- DUN, MD. et al. The chaperonin containing TCP1 complex (CCT/TRiC) is involved in mediating sperm-oocyte interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.42, p.36875-36887, 2011.
- FRASER,F.; STRZEZEK, J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing. **Theriogenology**, v.68, p.248-257, 2007.
- ICKWICZ D, FINKELSTEIN M, BREIBART H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology**, v.14, n.6, p.816-821, 2012.

MA, Q. et al. The expression characteristics of FAM71D and its association with sperm motility. **Human Reproduction**, v.32, n.11, p.2178-2178, 2017.

MAGUERESSE-BATTISTONI, B. Serine proteases and serine protease inhibitors in testicular physiology: the plasminogen activation system. **Reproduction**, v.134, p.721-729 2007.

MATEO, S. et al. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. **Proteomics**, v.11, n.13, p.2714-26, 2011.

MENDONÇA, GUILHERME ARANTES. Proteômica da matriz nuclear espermática suína. 2015. 56 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

MERIANOS HJ, WANG J, MOORE PB. The structure of a ribosomal protein S8/spc operon mRNA complex. **RNA, Department of Chemistry**, v.10, n.6, p.954-964, 2004.

MEYER HA, HARTMANN E. The yeast SPC22/23 homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.13159-13164 1997.

MICHIGAN. J. Computational proteomics analysis system (CPAS): An extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput biological experiments. **Journal of Proteome Research**. v.5, n.1, p.112-121, 2006.

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.

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**, v.10, n.4, p.0120060, 2015.

NUR-E-KAMAL, A. et al. Requirement of activated Cdc42-associated kinase for survival of -Ras-transformed mammalian cells. **Molecular Cancer Research**, v.3, n.5, p.297-305, 2005.

OLIVA, R. et al. Sperm cell proteomics. **Proteomics**, v.9, p.10004-1017, 2009.

PARK, Y. J. K et al. Fertility-related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. **Journal of Proteome Research**, v.11, p.4162-4168, 2012.

PHILLIPS D, APONTE AM, FRENCH SA, CHESS DJ, BLABAN RS. Succinyl-CoA Synthetase is a Phosphate Target for the Activation of Mitochondrial Metabolism. **Journal of Biochemistry**, v.48, n.30, p.7140-7149, 2009.

RAUCH, A. et al. 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. **Journal of Proteome Research**, v.5, n.1, p.112.-121, 2006.

YOUNG, SAM. et al. CRISPR/Cas9-Mediated Rapid Generation of Multiple Mouse Lines Identified Ccdc63 as Essential for Spermiogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.10, p.24732-24750, 2015.

SISMAN, AR. et al. Potential Novel Biomarkers for Diabetic Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Nerve Growth Factor Beta and Vascular Endothelial Growth Factor, **Disease Markers**, v.108106, p.7, 2014.

SOLER, DC. et al. 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. **Biology of Reproduction**, v.81, n.2, p.343-352, 2009.

SONG, WH. et al. Autophagy and ubiquitin–proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.113, n.36, p.5261-5270, 2016.

SUMITANI, M. et al, Endo H. Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids. **Journal of Biochemistry**, v. 146, n. 5, p. 725-32, 2009.

SRIPATY CE, CUNY M. Phosphorylation of a 40S ribosomal subunit protein in Tetrahymena. Lack of correlation with cellular growth and ribosome stability. **European Journal of Biochemistry**, v.162, n.3, p.669-74, 1987.

SUROVTSEVA, YV. et al. Mitochondrial Ribosomal Protein L12 selectively associates with human mitochondrial RNA polymerase to activate transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.44, p.17921-17926, 2011.

TAKEDA, H. et al. Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.16, p.10549-10554, 2002.

WANG, Z. et al. Small Ribosomal Protein Subunit S7 Suppresses Ovarian Tumorigenesis through Regulation of the PI3K/AKT and MAPK Pathways. **Plos One**. v.8, n.11, p.79117, 2013.

WON, SJ. et al. Molecular mechanism for isoform-selective inhibition of acyl protein thioesterases 1 and 2 (APT1 and APT2). **ACS Chemical Biology**, v.11, n.12, p.3374-3382, 2016.

XUAN, W. et al. 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 Research International**, v.2015, p.686239, 2015.

YANG H, GEIGER M. Cell penetrating SERPINA5 (Protein C inhibitor, PCI): More questions than answers. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.62, p.187-193, 2017.

YE Y, RAPE M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. Nature Reviews. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.10, n.11, p.755-764, 2009.

YUAN, S. et al. Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head-tail conjunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.112, n.5, p.430-9 2015.