

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

PROTEÍNAS CORRELACIONADAS COM O PROCESSO DE COMPACTAÇÃO DA
CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES DE TOUROS (*BOS TAURUS*)

Geovana Andrade Aparecido

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

Uberlândia – MG

Dezembro - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

PROTEÍNAS CORRELACIONADAS COM O PROCESSO DE COMPACTAÇÃO DA
CROMATINA DE ESPERMATOZOÍDES DE TOUROS (*BOS TAURUS*)

Geovana Andrade Aparecido

Prof. Dr. Marcelo Emílio Belletti

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

Uberlândia - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

PROTEÍNAS CORRELACIONADAS COM O PROCESSO DE COMPACTAÇÃO DA
CROMATINA DE ESPERMATOZOÍDES DE TOUROS (*BOS TAURUS*)

Geovana Andrade Aparecido

Prof. Dr. Marcelo Emílio Belletti

ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do

Curso de Biotecnologia em / / _____

Profº. Drº. Edgar Silveira Campos

Coordenador do curso de Biotecnologia - UFU

Uberlândia - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

PROTEÍNAS CORRELACIONADAS COM O PROCESSO DE COMPACTAÇÃO DA
CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES DE TOUROS (*BOS TAURUS*)

Geovana Andrade Aparecido

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

Á Deus por me permitir a realização desta pesquisa, por me conceder saúde, sabedoria e por todas as pessoas que ele escolheu para me auxiliar e dividir seus conhecimentos.

Aos meus pais Edmar e Rejane, que se dedicaram incansavelmente para que eu pudesse ter uma educação de qualidade.

Ao meu irmão Edmar Augusto, por todo incentivo e alegrias compartilhadas.

Á toda minha família, que se fez presente através das orações, palavras de carinho e que nunca faltaram quando precisei.

Aos meus amigos, por todos os bons momentos que tornaram essa caminhada menos árdua.

Aos colegas do grupo de pesquisa, em especial a Dra. Amanda Nonato, pelos ensinamentos e ao meu amigo Lucas Melo que se dispôs a me ajudar durante o trabalho de microscopia eletrônica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Belleti, pela confiança depositada, dedicação e por todo comprometimento.

Aos membros da banca, Dr. Romualdo Filho e Me. Muller Carrara Martins, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento do meu trabalho.

RESUMO

Durante a última fase da espermatogênese, a cromatina se torna altamente condensada pelo processo complexo onde proteínas nucleares básicas típicas de células somáticas e presentes na cromatina das espermátides, são gradualmente trocadas por proteínas de transição, que posteriormente são trocadas por protaminas. Erros no processo de compactação da cromatina geram espermatozoides que com cromatina totalmente ou parcialmente descompactada, o que interfere no processo de fertilização ou desenvolvimento embrionário. Cabeças de espermatozoide de amostras de sêmen de quatro touros com diferentes níveis de fertilidade foram utilizadas para identificação e quantificação das proteínas do núcleo espermático por espectrometria de massas avançada. Essas amostras também foram avaliadas quanto a compactação de cromatina por análise de imagem computacional de esfregaços corados com azul de toluidina.

Palavras-chave: compactação da cromatina, morfologia, protamina, proteoma.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
2) OBJETIVO	3
3) MATERIAL DE METÓDOS.....	3
3.1. Amostras.....	3
3.2. Isolamento das cabeças dos espermatozoides.....	3
3.3. Extração da Cromatina e Matriz Nuclear	5
3.4. Identificação das Proteínas	5
3.5. Processamento das Amostras.....	6
3.6. Análise por espectrometria de massas avançada	7
3.7. Quantificação de espermatozoides com alterações na compactação cromatínica. 7	
3.8. Análise estatística	9
4) RESULTADOS.....	9
5) DISCUSSÃO.....	11

6) CONCLUSÃO	21
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1) INTRODUÇÃO

O espermatozoide dos mamíferos é composto basicamente por cabeça e cauda ou flagelo. A cabeça consiste do acrossoma, o núcleo e, em menor quantidade, estruturas citoesqueléticas e citoplasma. O núcleo é haploide, contendo somente um membro de cada par cromossômico, e durante a última fase da espermatogênese, a cromatina se torna altamente condensada (BELETTI, 2013). Durante esse processo de condensação nuclear as histonas, proteínas nucleares básicas típicas de células somáticas e presente na cromatina das espermátides, são gradualmente trocadas por proteínas de transição (TP), que posteriormente são trocadas por protaminas. Este evento que envolve o desligamento e as vezes a degradação de muitas proteínas é executado no núcleo espermático e no citoplasma. Proteassomas e proteínas poliubiquitinadas, marcados para serem degradadas, são localizados em uma região não condensada do núcleo cercada por envoltório nuclear redundante. Os produtos desta degradação proteica são supostamente transportados ao citoplasma da região do colo do espermatozoide através de poros nucleares, e podem se tornar parte do corpo residual ou da gota citoplasmática que é removida da cauda espermática durante o final da maturação no epidídimo (HARAGUCHI et al, 2007, MORANDI FILHO, 2013). Com a substituição das proteínas que compõe a cromatina espermática, sequências de DNA (20 a 50 kb) são firmemente enroladas pelas protaminas, formando estruturas em forma de anéis sigmoidais ou toroides, reconhecidas como unidades básicas da cromatina espermática Os espermatozoides maduros podem possuir até 50.000 estruturas toroidais empacotadas no núcleo espermático. (HUD et al., 1993). O processo de condensação da cromatina pode falhar e gerar espermatozoides com cromatina total ou parcialmente compactada (BELETTI, 2013).

Touros que apresentam espermatozoides com morfologia, motilidade e enzimas normais podem se comportar como subfêrteis e mesmo animais comprovadamente férteis podem apresentar intervalos de subfertilidade inexplicáveis. Uma possível explicação destas alterações de fertilidade pode ser alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides (BELETTI e MELLO, 1996). Existem diversas metodologias de avaliação de alterações cromatínicas, no entanto, a identificação deste tipo de alteração não consta nos exames andrológicos geralmente utilizados para avaliação de touros, (BELETTI, 2013).

Um dos métodos mais usados para avaliação da cromatina é a análise da estrutura da cromatina espermática (sperm chromatin structure assay - SCSA), que utiliza laranja de acridina para avaliar a suscetibilidade do DNA à desnaturação (EVENSON et al., 1980). Os espermatozoides são submetidos a leve tratamento ácido ou térmico, corados com laranja de acridina e avaliados em citômetro de fluxo. Por meio dos gráficos gerados no citômetro de fluxo é possível quantificar os espermatozoides com fluorescência verde e vermelha, que seriam respectivamente, espermatozoides com cromatina normal e alterada (BELETTI, 2013). Outra técnica que pode ser utilizada para avaliação de alterações da cromatina espermática é a Metacromasia Induzida desenvolvida por Mello (1982), a qual consiste no uso de esfregaços de sêmen que após hidrólise ácida são corados com Azul de Toluidina (AT). Nesta técnica utiliza-se microscópio de luz convencional, onde espermatozoides normais exibem coloração que varia de verde a azul claro e os que possuem alteração de cromatina se coram em azul intenso a magenta, o que é denominado de metacromasia (o corante cora estruturas em cores diferentes da cor original apresentada pelo corante). Originalmente a avaliação de alterações da cromatina espermática por metacromasia induzida era realizada visualmente, possuindo um caráter subjetivo, podendo ocorrer

variações entre examinadores. Para minimizar esta subjetividade, Beletti et al. (2005), utilizaram análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corado com azul de toluidina, previamente tratados com HCl 4N. Desta forma as cores são diferenciadas pelos seus valores de pixels, diminuindo a subjetividade e permitindo a graduação das alterações. (BELETTI, 2013).

Hiraiwa (2015) baseados em Beletti et al. (2004) desenvolveu software que avalia esfregaços de sêmen de touro submetidos a Metacromasia Induzida” e classificam as alterações cromatínicas segundo a região da cabeça afetada. Souza et al. (2018) utilizaram a mesma classificação para imunofluorescência para protamina 1 e para esfregaços corados com DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), obtendo bons resultados.

2) OBJETIVO

Com o presente trabalho objetiva-se identificar proteínas da cabeça de espermatozoide de touro que quando em maior quantidade favoreçam ou interfiram no processo de compactação da cromatina espermática.

3) MATERIAL DE METÓDOS

3.1. Amostras

Foram utilizadas amostras de sêmen congeladas em meio tris-gema de quatro touros azebuados, sendo dois considerados férteis e dois subférteis.

3.2. Isolamento das cabeças dos espermatozoides

As 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 ressuscitado 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 ressuscitada 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 por Mendonça et al., (2017). 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 solução contendo 2,82M de cloreto de céσιο (CsCl), 25mM de Tris-EDTA, 5mM de MgCl₂ 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 foi ressuscitado com tampão Tris 25mM e 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. Apesar do pellet ser composto basicamente por cabeças de espermatozoides isoladas, ainda existia pequena contaminação por fragmentos de cauda.

3.3. Extração da Cromatina e Matriz Nuclear

Para a extração da cromatina foi adotado o protocolo modificado de Morandi Filho (2013), onde a amostra contendo cabeças isoladas foi ressuspensa em 500µL de solução contendo 1% de Triton X-100, 50mM tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA e 5µL 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 ressuspensa, após a última lavagem, em 500µL de tampão de descondensação (40mM 1,4-ditiotreitol (DTT), 0,25M (NH₄)₂S₄, 25mM Tris-HCl, pH 7,5, e 5µL 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.

3.4. Identificação das Proteínas.

Inicialmente, as amostras precipitadas foram ressuspensas 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 (1976) com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, cód. 500-0006, Lote L9700067 Rev J). A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA, preparada a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/ml, Sigma, Cód. # P5369-10 ml Lote 110M6005). As amostras foram distribuídas em 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.

3.5. 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 μ L da amostra (50 μ g).

Em resumo, as amostras foram submetidas à redução das pontes de dissulfeto das proteínas pela adição de DTT (ditiotreitól) 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 \geq 8,0 obtendo-se um volume final de 500 μ L. As amostras foram então incubadas com 1 μ g 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.

3.6. 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” (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 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.

3.7. Quantificação de espermatozoides com alterações na compactação cromatínica

Após a obtenção dos espermatozoides, três esfregaços de cada amostra foram feitos e fixados em etanol-ácido acético (3:1; v/v) por um minuto e posteriormente em etanol 70% por três minutos. Após a fixação, as amostras foram secas em temperatura ambiente. Posteriormente os esfregaços foram hidrolisados em ácido clorídrico 4N por 20 minutos e lavados em água destilada. Após a secagem, foi colocada uma gota de Azul de Toluidina 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) pH 4,0 sobre os esfregaços, os quais foram cobertos com lamínula e após três minutos imagens digitais de pelo menos 100 espermatozoides foram capturadas, utilizando-se um microscópio (Leica DM500) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica ICC50), com objetiva de imersão de 100 X.

Inicialmente as imagens digitais foram segmentadas por limiarização (thresholding), ou seja, foram obtidas imagens contendo somente cada uma das cabeças fotografadas.

As imagens das cabeças isoladas foram processadas por software desenvolvido em linguagem MATLAB e executado em OCTAVE, obtendo assim a área total de cada cabeça, e delimitando, quando existente, região da cabeça com descompactação da cromatina (CRUZ et al., 2014). Resumidamente o software avalia todas as cabeças de espermatozoide selecionando automaticamente as 20 cabeças mais compactadas (mais claras). A média dos valores de pixel dessas 20 cabeças foram consideradas como valor padrão e valores menores que essa média indicam alterações. Em seguida, foi calculado um limiar de cada cabeça usando esses valores como referência e a região que fosse menor que essa média foi delineada pelo software. A imagem resultante foi suavizada, usando um filtro Gaussiano ($\sigma=2$, $r=2,5$) para reduzir o ruído e melhor delimitar a região alterada. Finalmente o delineamento foi realizado pela demarcação de linhas brancas definindo a região.

Dessa forma, foi possível quantificar espermatozoides normais (sem região demarcada por linha branca) e espermatozoides com alteração cromatínica (com região demarcada por linha branca) (Fig. 1)

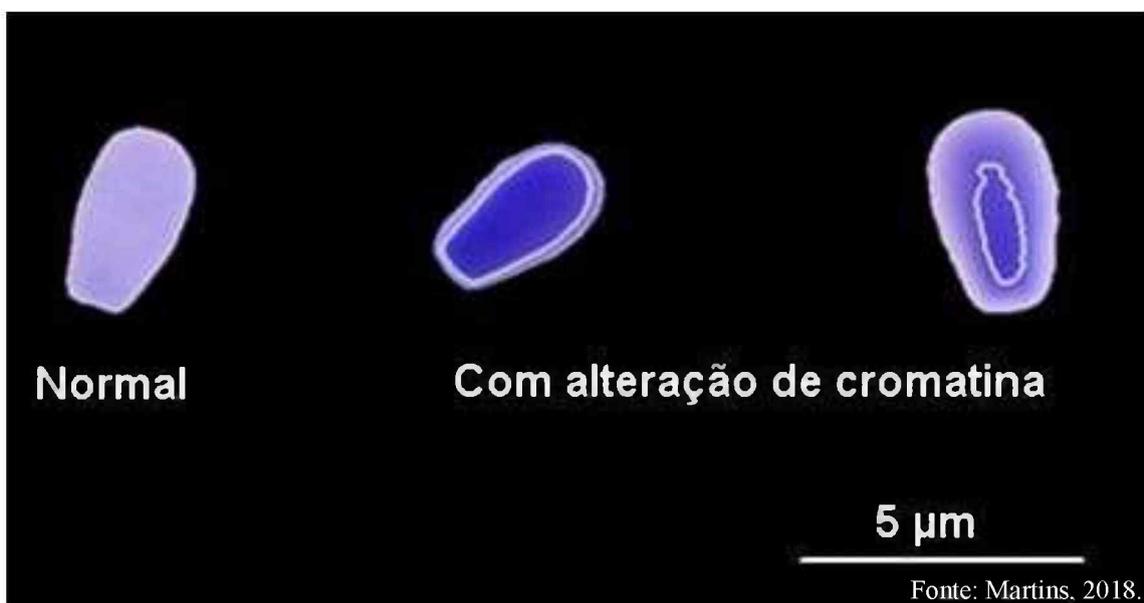


Figura 1: Cabeças de espermatozoides de touro avaliadas por software que identifica região com descompactação cromatínica.

3.8. 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.

Para identificar possíveis influências da quantidade de cada proteína identificada sobre os processos de compactação da cromatina foi calculada a correlação entre essa porcentagem e a porcentagem de espermatozoides sem alteração na compactação da cromatina espermática. Foram consideradas correlações significativas quando $p \leq 0,05$.

4) RESULTADOS

Na análise por espectrometria de massas foram identificadas 766 diferentes proteínas, sendo 452 encontradas em pelo menos dois touros e 300 proteínas encontradas apenas em amostras de um animal.

As proteínas que tiveram correlações significativas positivas (14) e negativas (8) com a porcentagem de espermatozoides sem alterações na compactação cromatínica são mostradas nas tabelas 1 e 2, respectivamente

Tabela 1. Proteínas com correlação significativa ($p \leq 0,05$) positiva com a porcentagem de espermatozoides sem alteração de compactação da cromatina.

Proteína	Valor de p	Coefficiente de correlação
----------	------------	----------------------------

Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase)	0,005720538	0,994279462
Ras-related protein Rab-30	0,006245203	0,993754797
ATP synthase subunit d, mitochondrial	0,011446663	0,988553337
Ran guanine nucleotide release factor (RanGNRF)	0,011743674	0,988256326
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial (ATP synthase subunit b)	0,014037932	0,985962068
Sperm protamine P1 (Cysteine-rich protamine)	0,023043658	0,976956342
PDZ and LIM domain protein 1 (Elfin)	0,023250631	0,976749369
Transcription factor A, mitochondrial (mtTFA)	0,024857124	0,975142876
Catenin alpha-1	0,028322635	0,971677365
Keratin, type II cytoskeletal 68 kDa, component IA (Fragment)	0,028688149	0,971311851
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 (UEV-1)	0,032236552	0,967763448
Sperm acrosome membrane-associated protein 4	0,034713849	0,965286151
Collagen alpha-1(I) chain (Alpha-1 type I collagen)	0,044313286	0,955686714
Chromogranin-A (CgA)	0,047088367	0,952911633

Tabela 2. Proteínas com correlação significativa ($p \leq 0,05$) negativa com a porcentagem de espermatozoides sem alteração de compactação da cromatina

Proteína	Valor de p	Coefficiente de correlação
Dysferlin (Dystrophy-associated fer-1-like protein)	0,003422041	-0,99657796
Seminal plasma protein PDC-109 (BSP-A1 and BSP-A2)	0,009704577	-0,99029542
Sperm acrosome membrane-associated protein 1	0,01094182	-0,98905818

Actin-like protein 7A	0,027476491	-0,97252351
Hexokinase-1	0,032669292	-0,96733071
B-cell receptor-associated protein 29 (Bap29)	0,0345943	-0,9654057
Heat shock-related 70 kDa protein 2	0,034705261	-0,96529474
Calicin	0,051607254	-0,94839275

5) DISCUSSÃO

Originalmente a intenção deste trabalho foi estudar as proteínas do núcleo do espermatozoide, mas, apesar da metodologia empregada já ter sido utilizada em outros trabalhos (MORANDI FILHO, 2013, MENDONÇA et al., 2017), aparentemente não foi totalmente eficiente no isolamento das proteínas nucleares, pois 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.

Como se torna impossível avaliar cada uma das proteínas em um único artigo, conforme o objetivo do presente trabalho, foi dada ênfase às proteínas que apresentaram correlação significativa positiva (14) ou negativa (8) com a porcentagem de espermatozoides sem alterações na compactação cromatínica.

Dentre as proteínas com correlação positiva com a compactação cromatínica estão algumas que em teoria seriam contaminantes de outros compartimentos celulares, tais como mitocôndria (Aconitate hydratase, mitochondrial, ATP synthase subunit d, ATP synthase F(0) complex subunit B1, Transcription factor A) e acrossoma (Sperm acrosome membrane-associated protein 4). Essas proteínas podem não estar

relacionadas efetivamente com o processo de compactação da cromatina, massa terem sua expressão aumentada nas condições ideais para que o processo ocorra de forma adequada. Assim, eles seriam possíveis marcadoras das condições ideais para a compactação da cromatina. Outra possibilidade é que o processo de compactação envolve o desligamento e as vezes a degradação de muitas proteínas, o que é executado no núcleo espermático e no citoplasma. Proteassomas e proteínas poliubiquitinadas, marcados para serem degradadas, são localizados em uma região não condensada do núcleo cercada por envoltório nuclear redundante. Os produtos desta degradação proteica são supostamente transportados ao citoplasma da região do colo do espermatozoide através de poros nucleares, e podem se tornar parte do corpo residual ou da gota citoplasmática que é removida da cauda espermática durante o final da maturação no epidídimo (HARAGUCHI et al, 2007, MORANDI FILHO, 2013). Assim, mesmo que a proteína não seja encontrada no núcleo do espermatozoide maduro, sua presença pode ser importante neste complexo evento ocorrido durante a espermiogênese.

A família das “ras-related protein RAB” ou “ras-related proteins in brain” são membros-chave da via de tráfico de membrana nas células. Além disso, identificou-se que essas proteínas possuem diversas funções, como a comunicação cruzada com diferentes quinases e que desempenham um papel na sinalização celular. No entanto, apenas algumas proteínas Rab tiveram seu papel descrito no desenvolvimento de células germinativas masculinas. As funções mais notáveis deste processo são realizadas por numerosos genes específicos de testículos e/ou específicos de células germinativas (STENMARK, OLKKONEN, 2001). No entanto, a RAB-30, que no presente trabalho apresentou correlação positiva com a compactação da cromatina espermática, nunca teve descrita função específica na espermatogênese ou em espermatozoides maduros.

Considerando as funções gerais da família desta proteína e que o processo de compactação da cromatina espermática envolve regiões com envoltório nuclear redundante e a formação da manchete (estruturas membranosas) (HARAGUCHI et al, 2007), provavelmente a RAB-30 participa intensamente deste processo e consequentemente aparece em altas quantidades em espermatozoides com compactação cromatínica normal. Da mesma forma, quando ocorre a baixa expressão desta proteína, o processo de compactação fica comprometido, gerando espermatozoides com áreas ou totalmente descompactado.

A proteína Ran, uma pequena GTPase da superfamília Ras, tem um papel central no controle tanto da montagem do fuso mitótico quanto da dinâmica do envoltório nuclear, além de ter papel no direcionamento do transporte nucleocitoplasmático durante a interfase. Em suma, a Ran desempenha um papel geral nas funções nucleares ao longo do ciclo de divisão celular (CLARKE, ZHANG, 2001). Já a “Ran guanine nucleotide release factor” (RanGNRF) pode regular o tráfico intracelular de RAN (MARFATIA et al., 2001), bem como promover a liberação de nucleotídeos guanina da RAN e inibir a ligação do novo GTP, impedindo a ligação do fator de troca de nucleotídeos RAN guanina RCC1. A RanGNRF também regula os níveis de RAN ligado ao GTP no núcleo e, portanto, desempenha um papel na regulação da dinâmica do fuso mitótico dependente da RAN (BAO et al. 2018). Não existe qualquer publicação que trate especificamente da função da RanGNRF na espermatogênese ou compactação da cromatina espermática. Considerando as funções até o momento descritas desta proteína e de seu alvo (proteína Ran), existe grande possibilidade dela participar direta ou indiretamente do processo de compactação da cromatina espermática, justificando a correlação positiva encontrada no presente projeto.

Como era esperado a protamina 1 apresentou correlação significativa positiva com a compactação da cromatina. A protamina 1 é a principal proteína que substitui as histonas durante a espermiogênese para que ocorra a formação das estruturas toroidais e conseqüentemente a compactação da cromatina espermática (BELETTI, 2013). A protamina 2 era considerada inexistente em espermatozoide de touro, mas recentemente Silva (2018), descreveu sua presença em espermatozoides desta espécie. No entanto, no presente estudo, a quantidade de protamina 2 não influenciou o processo de compactação.

A “PDZ and LIM domain protein 1” ou simplesmente elfin (anteriormente denominada CLIM1) é uma proteína que possui um domínio PDZ N-terminal e um domínio LIM C-terminal. Pertence à família das proteínas Enigma. As proteínas Enigma são uma família de proteínas citoplasmáticas que contêm um domínio PDZ N-terminal e uma série de domínios LIM C-terminais. Em virtude destes dois domínios que interagem com proteínas, as proteínas Enigma são capazes de interações proteína-proteína. Foi proposto que as proteínas Enigma podem atuar como adaptadoras entre quinases e o citoesqueleto. A elfin é abundantemente expressa no coração e colocaliza-se com alfa-actinina 2 nos discos Z do miocárdio. (KOTAKA et al, 2001). A elfin já foi descrita em seminomas (OKADA, 2003) e também como sendo o regulador negativo da organização do citoesqueleto, que precisa ser degradado pela via autofagia-dependente de lisossomos para facilitar a organização adequada do citoesqueleto na espermatogênese (SHANG et al, 2016). Portanto, a elfin está relacionada ao citoesqueleto e assim como outras proteínas, como por exemplo a actina (MENDONÇA et al., 2017), também pode fazer parte da matriz nuclear, o equivalente ao citoesqueleto no núcleo, sendo importante para o processo de compactação cromatínica.

A α -catenina é um membro da família das cateninas, moléculas de adesão célula-célula. Durante décadas pensou-se que as α -cateninas mediavam a adesão célula-célula, ligando o complexo de adesão célula-célula mediada por caderina com o citoesqueleto de actina. No entanto, os papéis das α -cateninas neste modelo clássico de adesão têm sido questionados recentemente. A α T-Catenina tem um padrão de expressão restrita, em contraste com a α E-catenina expressa de forma ubíqua. Níveis elevados de α T-catenina foram detectados no coração e nos testículos. A análise imuno-histoquímica mostrou uma localização específica da isoforma-X- α -catenina nas células germinativas diferenciadas. Em contraste com a proteína α T-catenina de tamanho normal padrão, esta isoforma-X encurtada pode ligar-se a l-afadina, um componente importante do complexo de adesão nectina/afadina/ponsina que supostamente é essencial para a espermatogênese (GOOSSENS et al., 2017). Portanto, já está demonstrado a importância da α -catenina e suas isoformas na espermatogênese, mas ainda sem total esclarecimento de como esta proteína atua no espermatozoide. Os resultados do presente estudo são sugestivos de que direta ou indiretamente essa proteína é importante no processo de compactação da cromatina espermática.

A queratina tipo II (Keratin type II) foi originalmente descrita como um componente do citoesqueleto, mas recentemente também foi identificada como componente da matriz nuclear (MENDOÇA et al, 2017). Portanto, os resultados do presente trabalho são sugestivos da participação direta desta proteína no processo de compactação da cromatina espermática.

A "Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1" (UEV-1) está envolvida no processo de ubiquitinação de proteínas (GUDGEN et al., 2004). Como já comentado, durante o processo de compactação da cromatina espermática, algumas proteínas nucleares das espermátides são ubiquitinadas, o que seria um marcador para que esta

proteína seja degradada (HARAGUCHI et al, 2007). Assim, a presença de grande quantidade desta proteína se faz necessária para que ocorra uma correta compactação cromatínica. Da mesma forma, a pouca quantidade desta proteína pode prejudicar o processo de compactação e conseqüentemente levar à formação de espermatozoides com alterações cromatínicas

A cadeia alfa-1 do colágeno tipo I (“Collagen alpha-1(I) chain (Alpha-1 type I collagen)”) é descrita como componente das fibras colágenas tipo I, encontradas em diversas variedades de tecidos conjuntivos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017). Até o presente trabalho, ainda não havia sido descrito a presença desta cadeia em espermatozoides, sendo difícil qualquer especulação de sua função nesta célula, envolvendo ou não o processo de compactação cromatínica. Também fica difícil considerar este achado uma simples contaminação, visto que as proteínas foram extraídas de espermatozoides ejaculados, portanto, sem qualquer possibilidade de contaminação de matriz extracelular de tecido.

A cromogranina-A (CgA) é o membro mais distribuído da família das graninas. As cromograninas são glicoproteínas aniônicas solúveis, encontradas na maioria das células neuroendócrinas e neurais, co-armazenadas com outras substâncias endócrinas (como insulina, glucagon, FSH e LH ou NPY) em grânulos de secreção. Fora da célula, foi sugerido que este peptídeo, ou um de seus fragmentos, obtido por clivagem proteolítica, poderia atuar de forma autócrina ou parácrina, regulando a função celular ou a contratilidade dos segmentos vasculares. Foi demonstrada uma distribuição mais ampla de células positivas para CgA em estruturas testiculares bovinas quando comparadas com aquelas relatadas em ratos e homens. Em bovinos, as células que expressam CgA estão presentes tanto no epitélio seminífero quanto na população de células de Leydig. Uma função parácrina ou autócrina para CgA no testículo é

concebível, o que é corroborado pela identificação de diversos fatores locais relacionados à CgA ou substâncias co-armazenadas com CgA nas gônadas masculinas (PAYAN-CARREIRA et al., 2006). Apesar de já existir informações relevantes sobre a presença CgA no testículo e em especial, nas células germinativas de bovinos, ainda não se sabe a verdadeira função desta proteína na espermatogênese. Os resultados do presente trabalho sugerem sua participação no processo de compactação da cromatina espermática.

Dentre as proteínas com correlação negativa com a compactação cromatínica a com correlação mais intensa foi a disferlina (“dysferlin (dystrophy-associated fer-1-like protein)”), a qual está relacionada com o reparo do músculo esquelético. Um defeito no gene DYSF, localizado no cromossomo 2p12-14, resulta em vários tipos de distrofia muscular. Uma redução ou ausência de disferlina, denominada disferlinopatia é caracterizada por fraqueza e perda de vários músculos esqueléticos voluntários (PASSOS-BUENO et al., 1993). Em testículos de cavalos pré-puberes (1,5 anos de idade) a espermatogênese inicia localmente em áreas claras e centrais que contrastam com áreas periféricas escuras que ainda estão inativas na espermatogênese. Comparando a expressão de 9132 genes nas áreas claras e escuras, Ing et al. (2004) verificaram que a disferlina era mais expressa na área escura, ou seja, em regiões em que ainda não existia espermatogênese plena. Portanto, a correlação negativa desta proteína com a compactação da cromatina espermática, pode não ser necessariamente devido a uma ação direta desta proteína interferindo no processo de compactação, mas o excesso desta proteína ser um marcador de espermatogênese incompleta, o que pode gerar espermatozoides com cromatina não totalmente compactada.

A principal proteína do plasma seminal bovino, a PDC-109 (“Seminal plasma protein PDC-109”), liga-se aos fosfolípidios da colina na membrana plasmática dos

espermatozoides e induz o efluxo de colesterol e fosfolipídios de colina, o que é um passo importante na capacitação espermática. A PDC-109 funciona como uma chaperona *in vitro*, sugerindo que ela pode auxiliar no dobramento adequado de proteínas envolvidas na via de capacitação de espermatozoides bovinos (SANKHALA, SWAMY, 2010). Apesar de sua ação positiva na capacitação espermática, a alta correlação negativa desta proteína com a compactação cromatínica encontrada no presente trabalho, sugere que sua presença na cabeça do espermatozoide pode interferir no processo de compactação.

A proteína 1 associada a membrana do acrossoma (“Sperm acrosome membrane-associated protein 1”), é uma proteína de membrana que se localiza no segmento equatorial de espermatozoides em mamíferos e funciona na fusão de espermatozoide-ovócito. Camundongos knockout para o gene Spacal (gene codificador desta proteína) são inférteis. A causa dessa esterilidade seria a modelagem anormal da cabeça do espermatozoide gerando globozoospermia em humanos. A não expressão de Spacal levou ao desaparecimento da placa nuclear, um denso revestimento do envelope nuclear voltado para a membrana acrossomal interna. Isto coincidiu com o fracasso da expansão acrossomal durante a espermiogênese e resultou na degeneração e desaparecimento do acrossoma em espermatozoides maduros. Assim, esses achados esclarecem parte da cascata que leva à globozoospermia (FUJIHARA et al., 2012). Ou seja, esta proteína está ligada ao acrossomo, mas também participa com a morfogênese da cabeça do espermatozoide. No entanto, de acordo com os achados do presente trabalho, sua presença em grande quantidade de alguma maneira interfere no processo de compactação cromatínica.

As proteínas relacionadas à actina (Arps) são uma família altamente conservada de proteínas que possuem extensa sequência e semelhança estrutural com a actina.

Todos os Arps caracterizadas são componentes de grandes complexos multiméricos associados à cromatina ou ao citoesqueleto. Além disso, o genoma humano codifica cinco Arps “órfãs” conservadas, mas largamente não caracterizadas, dentre elas a “Actin-like protein 7A” (Arp7A), que parecem ser específicas dos testículos. Foi mostrado que Arp7A, que possui 43% de identidade de sequência com β -actina, forma um complexo com as proteínas do citoesqueleto Tes e Mena na camada subacrosomal de espermátides arredondadas (BOËDA et al., 2011). A presença desta proteína em excesso poderia prejudicar o processo de compactação da cromatina ou, ao contrário, ela participaria do processo de compactação da cromatina e sua presença demonstraria que o processo estaria não finalizado.

As hexocinases (HKs) realizam o primeiro passo no metabolismo da glicose, catalisando a fosforilação da glicose para produzir glicose-6-fosfato (G6P). Entre as principais isoformas da hexoquinase: HK1, HK2, HK3 e HK4, a HK1 é a isoforma mais onipresente que se associa à mitocôndria através do seu domínio de ligação à porina (PBD) no segmento N-terminal da proteína. Sabe-se que as células germinativas masculinas têm uma arquitetura única para a glicólise, na qual as enzimas glicolíticas se agrupam na região da bainha fibrosa (FS) de espermatozoides. O flagelo do espermatozoide contém o mecanismo necessário para a motilidade e conforme demonstrado pelo silenciamento dos genes das enzimas HK, o ATP gerado via glicólise é essencial para a motilidade dos espermatozoides e fertilidade masculina (KUMAR et al., 2015). Baseado nestas informações, fica difícil sugerir qualquer mecanismo que justifique a correlação negativa entre a grande presença da proteína NK1 e a compactação cromatínica.

BAP29 (“B-cell receptor-associated protein 29”) e BAP31 são duas proteínas de membrana homólogas (~50% de identidade de sequência em humanos) que residem no

retículo endoplasmático (ER). Elas desempenham um papel no transporte anterógrado de proteínas de membrana do retículo endoplasmático para o Golgi. A BAP31 controla o destino de seus clientes ligados, que podem ser retidos no ER, progredir através da via secretória ou serem extrudados e submetidos à degradação associada ao ER. A BAP29 é bem menos estudada, mas é conhecido por auxiliar ou regular a função do BAP31 na classificação de alguns clientes, incluindo moléculas de IgD e MHC de classe I. A BAP31 e possivelmente a BAP29 estão além disso envolvidas na apoptose, participando da ativação da caspase-8 (QUISTGAARD et al., 2013). Isso poderia justificar a correlação negativa da BAP20 com a compactação da cromatina, pois o processo de apoptose culmina em fragmentação de DNA, o que certamente levaria alterações na compactação da cromatina espermática.

A proteína “Heat shock-related 70 kDa protein 2” (HSPA2) é frequentemente relacionada com subfertilidade masculina (INTASQUI et al., 2018). Ela é uma Chaperona implicada em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo proteção do proteoma contra estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém-sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e a formação e dissociação de complexos proteicos (RADONS, 2016). Sua presença em grande quantidade em espermatozoides com alterações na cromatina pode ser uma tentativa de correção destas alterações, atuando nas proteínas do processo de compactação da cromatina.

Na cabeça do espermatozoide dos mamíferos, o núcleo é fortemente associado, em muitas espécies na sua parte posterior, com uma estrutura citoesquelética não filamentosa grande e densa, o cálice, cujas principais proteínas são básicas, representando uma categoria de elemento citoesquelético (VON BÜLOW et al., 1995). Outros autores preferem denominar tal estrutura como teca perinuclear (TOSHIMORI,

2009). A calicina (“calicin”) é uma das proteínas que compõe esta estrutura. Segundo Modarres et al. (2019), a calicina também está associada a biogênese do acrossoma. O possível papel da calicina como um elemento do citoesqueleto morfogênico que atua na esp-emigênese é discutido, pois sua ausência está relacionada com formas de teratozoospermia em humano, tais como, "defeito da bainha pós-acrossomal” e "cabeça redonda", entre outras (VON BÜLOW et al., 1995). Assim como a proteína 1 associada a membrana do acrossoma, esta proteína está ligada ao acrossomo e participa da modelagem da cabeça do espermatozoide, pois sua deficiência pode gerar globozoospermia. Da mesma forma do que com a proteína 1 associada a membrana do acrossoma, de acordo com os achados do presente trabalho, sua presença em grande quantidade de alguma maneira interfere no processo de compactação cromatínica ou é marcador de um processo de compactação inacabado.

6) CONCLUSÃO

As proteínas aconitase, Rab-30, ATP sintetase subunidade d, RanGNRF, ATP sintetase subunidade b, protamina 1, Elfin, mtTFA, Catenina alfa-1, queratina tipo II, UEV-1, proteína 1 associada a membrana do acrossoma, cadeia alfa-1 do colágeno tipo I e cromogranina-A de alguma forma participam direta ou indiretamente do processo de compactação da cromatina espermática em bovinos. Já as proteínas disferlina, PDC-109, proteína 1 associada a membrana do acrossoma, Arp7A, Hexoquinase-1, Bap29, HSPA2 e Calicina de alguma forma, direta ou indiretamente, interferem no processo de compactação da cromatina espermática em bovinos, ou são marcadores de um processo de compactação inacabado.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroidal stability using single DNA molecules. **Mol. Reprod. Develop.** 56, 230–234. 2000.

BOËDA, B.; KNOWLES, P.P.; BRIGGS, D.C.; MURRAY-RUST, J.; SORIANO, E.; GARVALOV, B.K.; MCDONALD, N.Q.; WAY, M. Molecular recognition of the Tes LIM2-3 domains by the actin-related protein Arp7A. **J Biol Chem.** v.286, n.13, p.11543-11554, 2011.

BAO, X.; LIU, H.; LIU, X.; RUAN, K.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; HU, Q.; LIU, Y.; AKRAM, S.; ZHANG, J.; GONG, Q.; WANG, W.; YUAN, X.; LI, J.; ZHAO, L.; DOU, Z.; TIAN, R.; YAO, X.; WU, J.; SHI, Y. Mitosis-specific acetylation tunes Ran effector binding for chromosome segregation. **J Mol Cell Biol.**, v.10, n.1, p.18-32, 2018.

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.

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

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

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev Brasil Reproduction Animal**, v. 37, p. 92-96, 2013.

BOËDA, B.; KNOWLES, P.P.; BRIGGS, D.C.; MURRAY-RUST, J.; SORIANO, E.; GARVALOV, B.K.; MCDONALD, N.Q.; WAY, M. Molecular recognition of the Tes LIM2-3 domains by the actin-related protein Arp7A. **J Biol Chem.** v.286, n.13, p.11543-11554, 2011.

BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt Biochem**, 72:248-254.

CLARKE, P.R.; ZHANG, C. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? **Trends Cell Biol.**, v.11, n.9, p.366-371, 2001.

CRUZ, R. E. S.; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. **In: Proceedings of the X Workshop de Visão Computacional**, Uberlândia- MG., p. 270-274, 2014.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210, p.1131-1133, 1980.

FUJIHARA, Y.; SATOUH, Y.; INOUE, N.; ISOTANI, A.; IKAWA, M.; OKABE, M. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. **Development.**, v.139, n.19, p.3583-3589, 2012.

GOOSSENS, S.; JANSSENS, B.; VANPOUCKE, G.; DE RYCKE, R.; VAN HENGEL, J.; VAN ROY, F. Truncated isoform of mouse alphaT-catenin is testis-restricted in expression and function. **FASEB J.** v.21, n.3, p.647-655, 2007.

GUDGEN, M.; CHANDRASEKARAN, A.; FRAZIER, T.; BOYD, L. Interactions within the ubiquitin pathway of *Caenorhabditis elegans*. **Biochem Biophys Res Commun.** v.325, n.2, p.479-486, 2004.

HARAGUCHI C.M.; MABUCHI T.; HIRATA S.; SHODA T.; TOKUMOTO T.; HOSHI K.; YOKOTA S.; Possible function of caudal nuclear pocket: degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm. **J Histochem Cytochem.** Jun;55(6):585-95. 2007.

HIRAIWA, S.H. Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência na produção in vitro de embriões. 2015. 70 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

HUD N.V.; ALLEN M.J.; DOWNING K.H.; LEE J.; BALHORN R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. **Biochem Biophys Res Commun.** Jun 30;193(3):1347-54. 1993.

ING, N.H.; LAUGHLIN, A.M.; VARNER, D.D.; WELSH, T.H.; FORREST, D.W.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. Gene expression in the spermatogenically inactive "dark" and maturing "light" testicular tissues of the prepubertal colt. **Journal of Andrology**, v.25, n.4, p. 535-544, 2004.

INTASQUI, P.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.; SAMANTA, L.; BERTOLLA, R.P. Towards the identification of reliable sperm biomarkers for male infertility: A sperm proteomic approach. **Andrologia.** v.50, n.3, artigo number e12919, 2018.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto & Atlas**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; ed.13, 568 p., 2017.

KOTAKA, M.; LAU, Y.M.; CHEUNG, K.K.; LEE, S.M.; LI, H.Y.; CHAN, W.Y.; FUNG, K.P.; LEE, C.Y.; WAYE, M.M.; TSUI, S.K. Elfin is expressed during early heart development. **J Cell Biochem.**, v.82, n.3, p. 463-72, 2001.

KUMAR, S.; PARAMESWARAN, S.; SHARMA, R.K. Novel myristoylation of the sperm-specific hexokinase 1 isoform regulates its atypical localization. **Biology Open**, v.4, p.1679-1687, 2015.

MARFATIA, K.A.; HARREMAN, M.T.; FANARA, P.; VERTINO, P.M.; CORBETT A.H. Identification and characterization of the human MOG1 gene. **Gene**, v.266, n.1-2, p.45-56, 2001.

MARTINS, M.C. Avaliação da compactação da cromatina durante a maturação do espermatozoide no epididimo de touros. 2018. 44 f. Dissertação (**Mestrado em Ciências Veterinárias**) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry** v.74, p.387-392, 1982.

MENDONÇA, G.A.; MORANDI FILHO, R.; SOUZA E.T.; GAGGINI, T.G.; M.C.A.; R.A.; 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.

MODARRES, P.; TAVALAEE, M.; GHAEDI, K.; NASR-ESFAHANI, M.H. An Overview of The Globozoospermia as A Multigenic Identified Syndrome. **Int J Fertil Steril**. v.12, n.4, p.273-277, 2018.

MORANDI FILHO, R. Análise da estrutura e identificação de proteínas da cromatina nuclear espermática de bovinos. 2013. 66 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

OKADA, K.; KATAGIRI, T.; TSUNODA, T.; MIZUTANI, Y.; SUZUKI, Y.; KAMADA, M.; FUJIOKA, T.; SHUIN, T.; MIKI, T.; NAKAMURA, Y. Analysis of gene-expression profiles in testicular seminomas using a genome-wide cDNA microarray. **Int J Oncol.**, v.23, n.6, p.1615-1635, 2003.

PASSOS-BUENO, M.R.; RICHARD, I.; VAINZOF, M.; FOUGEROUSSE, F.; WEISSENBACH, J.; BROUX, O.; COHEN, D.; AKIYAMA, J.; MARIE, S.K.; CARVALHO, A.A. "Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families". **J. Med. Genet.** v.30, n.5, p.385–387, 1993.

PAYAN-CARREIRA, R.; RODRIGUES, P.; CARVALHO, P.R. Chromogranin-A expression in the bovine testis. **Anim Reprod Sci.** v.96, n.1-2, p. 146-153, 2006.

QUISTGAARD, E.M.; LÖW, C.; MOBERG, P.; GUETTOU, F.; MADDI, K.; NORDLUND, P. Structural and Biophysical Characterization of the Cytoplasmic Domains of Human BAP29 and BAP31. **PLoS ONE**, v.8, n.8, Article number e71111, 2013.

RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress Chaperones**. v.21, n.3, p.379-404, 2016.

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.**, v.5, n.1, p.112–121, 2006.

SANKHALA, R.S.; SWAMY, M.J. The Major Protein of Bovine Seminal Plasma, PDC-109, Is a Molecular Chaperone. **Biochemistry**, v.49, n.18, p.3908–3918, 2010.

SHANG, Y.; WANG, H.; JIA, P.; ZHAO, H.; LIU, C.; LIU, W.; SONG, Z.; XU, Z.; YANG, L.; WANG, Y.; LI, W. Autophagy regulates spermatid differentiation via degradation of PDLIM1. **Autophagy**. v.12, n.9, p.1575-1592, 2016.

SILVA, R.T. Proteoma nuclear e micro-RNAs de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis. 2018. 77 f. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SOUZA, E. T. et al. Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. **Reproductive biology**, v.18, n.2, p.177-181, 2018.

STENMARK, H; OLKKONEN, VM. The Rab GTPase family. **Genome Biol.**, v.2, n.5, REVIEWS 3007, 2001.

TOSHIMORI, K. Dynamics of the perinuclear theca. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology**, v.204, p.43-44, 2009.

VON BÜLOW, M.; HEID, H.; HESS, H.; FRANKE, W.W. Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. **Exp Cell Res**. v.219, n.2, p.407-413, 1995.